

## INVESTIGAÇÃO DO ÁCIDO LÁURICO COMO INIBIDOR DA PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS DE *Candida albicans*

**RECH, Maquelis Tavares<sup>1</sup>; OLIVEIRA, Simone Gomes Dias<sup>2</sup>; LUND, Rafael Guerra<sup>3</sup>; PIVA, Evandro<sup>4</sup>;**

<sup>1</sup> Aluna de Graduação em Odontologia (FOP-UFPeI),<sup>2</sup> Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Odontologia (FOP-UFPeI) e Bolsista PIBIC-CNPq;

<sup>3</sup> Professor do Departamento de Odontologia Restauradora (FOP/UFPeI);

<sup>4</sup> Orientador do trabalho e professor do Departamento de Odontologia Restauradora (FOP/UFPeI.-  
[maquelis.rech@hotmail.com](mailto:maquelis.rech@hotmail.com)

### 1 INTRODUÇÃO

A implantação de próteses dentárias podem alterar o ecossistema bucal, causando um aumento nos microorganismos (JORGE et al., 1997) acarretando doenças bucais como a “Candidíase Atrófica Crônica” (CAC), também conhecida por “Estomatite por Dentadura”. Estima-se que *Candida* spp. afeta 50% dos usuários de prótese, pois tem alta eficiência em aderir e colonizar a superfície das próteses (LUND et al., 2009). Essa patologia é causada principalmente pela espécie *C. albicans* (CABRAL, 1990) e é uma forma de candidíase oral do tipo eritematosa, caracterizada por vários graus de eritema, petéquias hemorrágicas localizadas na área das bordas de dentaduras de uma prótese superior removível (MOREIRA et al., 2002).

A patogenicidade da *Candida albicans* está relacionada a uma combinação de fatores que contribuem para a sua virulência. Um destes fatores são produção das enzimas hidrolíticas extracelulares: proteinases e fosfolipases. As proteinases hidrolisam ligações peptídicas e atuam sobre queratina, colágeno, albumina, hemoglobina, dentre outros. Causando grande prejuízo aos tecidos do hospedeiro e aumento da resistência a anti-fúngicos. Já as fosfolipases hidrolisam os fosfoglicerídeos com isso elas facilitam a adesão tecidual nos lipídeos da membrana celular da célula hospedeira (MORIS et al, 2008).

Apesar de existirem muitos tratamentos para a CAC, a pesquisa por formas alternativas de antifúngicos se mostra fundamental, pois alguns tratamentos clássicos apresentam efeitos colaterais decorrentes do uso prolongado. Além disso, muitas cepas de *C. albicans* já demonstram resistência a tais tratamentos (MACHADO et al., 2010).

Uma alternativa possível é o ácido láurico, também conhecido como ácido dodecanóico (C12). Este ácido é um produto natural e, por isso, é provável que não seja tóxico em baixas quantidades e é encontrado no óleo de coco babaçu e no leite (MACHADO et al., 2006). Ele contém propriedades antimicrobianas (KABARA et al., 1972; ROUSE et al, 2005), antifúngicas e antivirais (BERGSSON et al., 2001). Na função antibacteriana o ácido se mostra eficaz tanto com bactérias Gram-positivas, como o *S. aureus* (ROUSE et al., 2005), quanto em bactérias Gram-negativas, como a *Neisseria gonorrhoeae*. Enquanto que nas funções antiviral e antifúngica ele é eficaz contra os vírus envelopados e *C. albicans*, respectivamente (BERGSSON et al., 2001). Frente a esses efeitos positivos já comprovados cientificamente, este estudo objetivou avaliar o potencial anti-enzimático do ácido láurico frente a *Candida albicans*.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

### 2.1. Meio fosfolipase

Para a avaliação da atividade de fosfolipase, será utilizado um meio de cultura contendo os seguintes produtos, nessas medidas: 57,3g de cloreto de sódio; 0,55g de cloreto de cálcio e 100ml de gema de ovo estéril 50% por litro de água destilada estéril.

### 2.2. Meio proteinase

Para a avaliação da atividade de proteinase, será utilizado um meio de cultura contendo os seguintes produtos, nessas medidas: 2g de albumina sérica bovina; 1,45g de base nitrogenada para leveduras; 20g de glicose e 20g de ágar-ágar por litro de água destilada estéril.

### 2.3. Preparação do inóculo

Na realização deste teste foram utilizadas cepas identificadas e catalogadas no laboratório de microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (FO-UFPEl). Para o estudo foram utilizadas 16 cepas.

Estas cepas foram repicadas em meio Agar Sabouraud Dextrose 24 horas antes do teste. Colocando-se uma alíquota de cepa em um tubo de ensaio com 5 mL de PBS, ajustando com teste de distorção e turbidez de 0,5 na escala de MacFarland.

### 2.4. Preparação do produto

O ácido láurico foi diluído em álcool 70° e procedeu-se a realização da diluição seriada. As concentrações variaram de 250 µg/ml até 15,6 µg/ml. Misturou-se 20µL do produto, proveniente da diluição, com 1980 µL de PBS.

Então, 0,5 mL do inóculo foi colocado no produto e incubado por 30 min em uma estufa a 37°C. Após retirada da estufa, o composto inóculo/produto foi colocado em uma centrífuga por 15 min a 300 RPM. Seguidamente foi lavado duas vezes com PBS 1% esterilizado (retira-se 200 µL de cada tubo, e acrescenta-se 200 µL do PBS). Após isso, os tubos foram agitados em um vórtex e pipetados 20 µL da suspensão inóculo/produto nos meios de cultura previamente preparados. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 37°C para realização da leitura. Cada teste foi repetido duas vezes.

### 2.4. Leitura

Para a proteinase a leitura foi realizada em 72h. Já para o meio fosfolipase está ocorreu em 96h.

O diâmetro do halo e o diâmetro da colônia foram mensurados. Realizou-se depois a razão do diâmetro da colônia pelo diâmetro total, assim foi calculado o Pz (Atividade Anti-enzimática). Para a proteinase:  $PZ = 1$ , Negativa;  $PZ \geq 0,64 < 1$ , Positiva-Média,  $PZ \leq 0,63$  Positiva-Elevada. Já na fosfolipase:  $Pz=1$  indicaram ausência de atividade enzimática e  $Pz=1$  indicaram graus positivos de fosfolipase (MORIS, et al. 2008).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado temos que os valores de Pz para a fosfolipase é Pz=0,77 para o produto e Pz=0,63 para o controle. Já na proteinase temos Pz=0,19 no controle e Pz= 0,20 após a exposição das leveduras ao composto. Estes resultados estão expostos nos quadros 1 e 2.

Quadro 1. Valores de Pz em relação a concentração do Ácido Láurico ( $\mu\text{g/ml}$ ) no meio proteinase.

<b>Concentração</b>	0	15,6	31,25	62,5	125	250
<b>PZ</b>	0,19	0,22	0,21	0,20	0,19	0,19

Quadro 2. Valores de Pz em relação a concentração do Ácido Láurico ( $\mu\text{g/ml}$ ) no meio fosfolipase.

<b>Concentração</b>	0	15,6	31,25	62,5	125	250
<b>PZ</b>	0,63	0,76	0,76	0,76	0,77	0,80

Com o aumento dos casos de resistência microbiana, surge a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções e uma alternativa para a busca desses fármacos está na investigação de produtos naturais. Um dos tipos de extratos vegetais obtidos de plantas medicinais são os óleos essenciais, ricos em ácidos graxos com propriedades farmacológicas. Os ácidos graxos vêm despertando o interesse dos pesquisadores, pois apresentam alta capacidade antimicrobiana (BERGSSON et al., 2001; HUANG et al., 2010; SKALICKA-WOŹNIAK et al., 2010). Neste grupo, se encontra o ácido láurico, que é um ácido graxo de cadeia longa ( $C_{12}$ ) saturado, disponível no óleo de coco e no óleo de sementes de palma (MACHADO et al., 2006; HUANG et al., 2010) e que, por ser um produto natural, provavelmente não seja tóxico em baixas quantidades. E já é conhecido que ele apresenta propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais (KABARA et al., 1972; ROUSE et al., 2005; BERGSSON et al., 2001).

Foi observado que as cepas possuem alta atividade enzimática, tanto na fosfolipase (Pz=0,63) quanto na proteinase (Pz=0,19). Quando foi ministrado o produto não houve diferença nas leituras. Na proteinase o produto não foi eficaz, pois o melhor resultado foi na concentração 15,6  $\mu\text{g/ml}$  (Pz=0,22), demonstrando que a atividade da secreção enzimática segue alta. Já na fosfolipase, mesmo sem diferença estatística, a atividade enzimática das cepas foi Pz=0,80  $\mu\text{g/ml}$  na maior concentração 250  $\mu\text{g/ml}$ , demonstrando que o produto foi eficaz, pois a quantidade secretada passou de alta (Pz=0,63) para baixa (Pz=0,80). Com isso fica evidente a necessidade de novos testes para o ácido, como o teste de aderência.

#### 4 CONCLUSÃO

Com base neste estudo *in vitro*, pode-se concluir que o Ácido Láurico é um agente antifúngico promissor, nas concentrações testadas.

#### 5 REFERÊNCIAS

- BERGSSON, G.; ARNFINNSSON, J.; STEINGRIMSSON, Ó.; THORMAR, H. In Vitro Killing of *Candida albicans* by Fatty Acids and Monoglycerides. **J. Antimicrobial Chemotherapy**, v.45, p. 3209–3212, 2001.
- CABRAL, L.A.G.; Emprego da imunofluorescência direta no estudo das alterações de mucosa de palato, compatíveis com candidíase atrófica crônica, em indivíduos portadores de próteses dentárias totais muco-suportadas. **Revista Odontológica**. UNESP, São Paulo, v.19, p.125-139, 1990.
- CLSI - Clinical And Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition. CLSI document M27-A3. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008
- DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, p. 1629-1642, 2010.
- HUANG, C.B.; GEORGE, B.; EBERSOLE, J.L. Antimicrobial activity n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. **Archives of Oral Biology**, v. 55, p. 555-560, 2010.
- JORGE, A. O. C. Presença de levedura do gênero cândidas na saliva de pacientes de diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Revista Odontológica**. USP, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 279-285, 1997.
- KABARA, J.J.; SWIECZKOWSKI, D.M.; CONLEY, A.J.; TRUANT, J.P. Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. **J. Antimicrobial Chemotherapy**, p. 23-28, 1972.
- LUND, R.G.; NASCENTE, P.S.; ETGES, A.; RIBEIRO, G.A.; ROSALEN, P.L.; DEL PINO, F.A.B. Occurrence, isolation and differentiation of *Candida* spp. And prevalence of variables associated to Chronic atrophic candidiasis. **Mycoses**. 2009.
- MACHADO, G.C.; CHAVES, J.B.P.; ANTONIASSI, R. Composição em ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco babaçu. **Rev. Ceres**, p.463-470, 2006.
- MACHADO, F.C.; PORTELA, M. B.; CUNHA, A. C.; SOUZA, I. P. R.; SOARES, R. M. A.; CASTRO, G. F. B. A.; Antifungal activity of chlorhexidine on *Candida* spp. biofilm **Revista Odontológica**. UNESP, Araraquara, v.39, p. 271-275, 2010.
- MOREIRA, A.C.A; FALCÃO, A.F.P.; ANDRADE, E. R. S.; SOUZA, E. R. Isolation of *Candida parapsilosis* in a patient with clinic diagnosis of chronic atrophic candidiasis *Ci. Méd. Biol.*, v. 1, n. 1, p. 124-128, 2002.
- MORIS, D. V. et al . Oral *Candida* spp. colonization in human immunodeficiency virus-infected individuals. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, Botucatu, v. 14, n. 2, 2008 .
- ROUSE, M.S.; ROTGER, M.; PIPER, K.E.; STECKELBERG, J.M.; SCHOLZ, M.; ANDREWS, J.; PATEL, R. In Vitro and In Vivo Evaluations of the Activities of Lauric Acid Monoester Formulations against *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrobial Chemotherapy**, vol.49, n. 8, p. 3187-3191,2005.
- SKALICKA-WOŹNIAK, K.; LOS, R.; GŁOWNIAK, K.; MALM, A. Antimicrobial Activity of Fatty Acids from Fruits of *Peucedanum cervaria* and *P. alsaticum*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 2748-2754, 2010.
- ZHENG, C.J.; YOO, J.S.; LEE, T.G.; CHO, H.Y.; KIM, Y.H.; KIM, W.G. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. **FEBS Letters**, v. 579, n. 23, p. 5157-5162, 2005.