ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ESTABILIDADE DE CREME VAGINAL FORMULADO À BASE DE CINAMALDEÍDO COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

Sérgio Luís Sales de Oliveira;[1] Iven Neylla Farias Vale Mendes[2]; Cristina de Andrade Monteiro[3]

[1] Estudante do Curso de Licenciatura em Biologia do Instituto Federal do Maranhão campus São Luís - Monte Castelo; E-mail: sergiosales@acad.ifma.edu.br.

[2] Doutora, docente do Instituto Federal do Maranhão campus Itapecuru-Mirim; E-mail: iven.mendes@ifma.edu.br.

[3] Doutora, docente do Instituto Federal do Maranhão campus São Luís - Monte Castelo; E-mail: cristinamonteiro@ifma.edu.br.

RESUMO

Devido ao aumento alarmante das infecções fúngicas, da resistência dos isolados obtidos, da alta taxa de morbidade da candidíase vaginal e severidade dos casos recorrentes, o objetivo desta pesquisa é validar uma formulação vaginal única, contendo cinamaldeído (CNMA) avaliando sua eficácia no tratamento de candidíase vulvovaginal. O CNMA foi incorporado ao creme vaginal em duas concentrações (2% e 4%). Os cremes foram testados contra linhagens de *Candida* spp. provenientes de secreção vaginal de mulheres com suspeitas clínicas de vaginite fúngica. Os testes antifúngicos foram feitos por meio de ágar difusão e microdiluição. Amostras de cremes também foram submetidas a testes de centrifugação e estabilidade física bem como a caracterização de suas propriedades organolépticas. As formulações mantiveram-se estáveis e com capacidade inibitória contra as leveduras *Candida albicans* e *Candida glabrata* clínicas, mostrando alto potencial como formulação antifúngica alternativa, eficaz e promissora no tratamento da candidíase vulvovaginal.

Palavras-chave: Atividade antifúngica. Creme vaginal. Cinamaldeído. *Candida*. Candidíase vulvovaginal.

Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal (CVV), embora seja assintomática em 90% dos casos relacionados à *Candida albicans*, é a segunda principal causa de vaginite infecciosa (Coudray; Madhivanan, 2020). Nos últimos dez anos, a prevalência de CVV tem aumentado, com novas espécies tais como *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* sendo identificadas (Sobel, 2016). CVV pode causar coceira, dor, irritação, odor desagradável, dispareunia e queimação, afetando 75% das mulheres ao longo da vida. Destas, 5% sofrem de candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), com mais de quatro episódios anuais, o que agrava os sintomas (Denning *et al*., 2018).

Embora não seja letal, a CVV compromete a saúde física e psicológica, impactando relacionamentos e podendo resultar em complicações como infertilidade e parto prematuro. Assim, tornou-se uma preocupação crescente de saúde pública global (Papon; Naglik, 2021; Mckloud *et al*., 2021).

A terapêutica atual depende de poucos medicamentos, aplicados tópica ou oralmente, o que favorece a disbiose da microbiota vaginal e aumenta a resistência a antifúngicos (*Candida* spp.) (De Oliveira Santos *et al*., 2021). Isso reforça a necessidade de novas substâncias bioativas com efeitos colaterais mínimos (Ré *et al*., 2021).

Recentemente, os óleos essenciais ganharam destaque por serem ricos em metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas. O cinamaldeído (CNMA), principal componente do óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), tem se mostrado promissor como antifúngico. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu e está investigando a eficácia e a estabilidade de um creme vaginal à base de CNMA como alternativa no tratamento da CVV. Essa pesquisa se destaca pela inovação, pois não há outros estudos focados em cremes vaginais com CNMA. Apesar da alta prevalência e morbidade da CVV, ainda são escassos os estudos sobre novos tratamentos naturais para infecções fúngicas, que geralmente são tratados de forma empírica. O objetivo da pesquisa foi verificar a atividade antifúngica e a estabilidade de creme vaginal formulado à base de cinamaldeído como alternativa para o tratamento de candidíase vulvovaginal.

METODOLOGIA

Aquisição, diluição e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do CNMA

O CNMA (98%) foi adquirido da Sigma-Aldrich, diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a 2% no intervalo de concentração de 0,0234 a 24 mg/mL. CNMA (100 µL) foi testado por microdiluição junto a 100 µL tanto de RPMI contra linhagens de *Candida* provenientes de secreção vaginal e padrão, acompanhados de fluconazol e anfotericina B.

Preparação de creme vaginal à base de CNMA

Foram preparadas duas formulações de cremes com ambas contendo CNMA nas concentrações 2 e 4%. Foi utilizado um tipo de creme base, não iônico. Além disso, o creme base, sem CNMA, foi utilizado como controle nos experimentos.

Testes de estabilidade dos cremes vaginais formulados

Os testes de estabilidade foram feitos de acordo com a Farmacopeia Brasileira, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2019). Os cremes estiveram mantidos em frascos de plástico com tampas rosca, opacos, ao abrigo da luz, com excelente vedação, mantidos à temperatura ambiente (28ºC). Primeiramente foram centrifugados (3.000 rpm, 30 minutos), e, se estáveis, foram feitos os demais testes. As formulações foram submetidas às temperaturas ± 28 ºC, 35 ºC (± 2 ºC) e 4 ºC, sendo avaliadas por 1, 7, 15, 30, 63, 90 e 135 dias, para observação parâmetros organolépticos (aspecto, cor, odor), físico-químicos (valor de pH e separação de fase por centrifugação) e análise microbiológica.

Aspectos éticos da pesquisa

As linhagens por serem de prospecção clínica humana foram submetidas a uma comissão de ética em pesquisa (CEP) para execução dos testes. Obtendo a aprovação e identificado pelo parecer consubstanciado número 2.519.446/2018 – CEP/UNICEUMA.

As linhagens utilizadas foram as padrões *Candida albicans* ATCC 90028, ATCC SC5314, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida parapsilosis* ATCC 69548, *Candida krusei* ATCC 6258 (Coleção de culturas do Departamento de Biologia, IFMA – Monte Castelo) e as clínicas *Candida albicans* JPA, CAS, IC-CA-03, IC-CA-11, IC-CA-23 (Laboratório de Imunofisiologia, Depto. de Patologia/UFMA), *Candida glabrata* MJNOP, FCSO, CFDS e FJF (Coleção de culturas do Depto de Biologia/IFMA – Monte Castelo). Todas foram cultivadas em meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) e

armazenadas a 4 ºC. Para inoculação, foram ressuspendidas em solução tampão fosfato salina (PBS) com ajuste para 1 – 5 × 10^6 UFC/mL.

Atividade antimicrobiana dos cremes vaginais em ágar difusão (Terças *et al*., 2017).

Cada creme (100 µL) foi depositado em poços na superfície do meio SDA semeado com linhagens *Candida* spp. A incubação foi a 35 ºC por 24h. O aparecimento de halos de inibição ao redor dos poços foi indicativo de atividade antifúngica. Estes foram medidos em milímetros e os valores registrados. Os controles foram em poços com PBS (100 µL, negativo) e com fluconazol (100 µL, positivo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentração inibitória mínima do CNMA

Determinada por ensaio de microdiluição contras as linhagens padrão e clínicas vaginais de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. O CNMA inibiu todas as linhagens com CIM variando entre 9 – 312 µg/mL. Percebe-se linhagens resistentes a Fluconazol (128 µg/mL) (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de Concentração Inibitória mínima (CIM) de Antifúngicos padrões e do Cinamaldeído frente a linhagens padrão e isolados clínicos de *Candida* spp. obtidas de secreção vaginal.

Amostras	Linhagens	CIM (µg/mL)		
		ANB	FLZ	CNMA
ATCC 90028	*Candida albicans*	0,5	4	78
ATCC SC5314	*Candida albicans*	2,0	0,5	78
ATCC 2001	*Candida glabrata*	0,25	16	78
ATCC 69548	*Candida parapsilosis*	0,5	4,0	19
ATCC 6258	*Candida krusei*	2,0-1,0	16	9,0
MJNOP	*Candida glabrata*	2,0	128	156
FCSO	*Candida glabrata*	0,5	128	312
JPA	*Candida albicans*	0,5	8,0	312
CAS	*Candida albicans*	0,5	8,0	312

Legenda: ANB – Anfotericina B; FLZ – Fluconazol e CNMA – Cinamaldeído.
Fonte: Autores (2024).

As concentrações obtidas no teste viabilizaram a concentração adequada para a formulação dos cremes vaginais com CNMA.

Estabilidade dos cremes vaginais

Conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira, foram realizados os testes de avaliação das propriedades organolépticas, de estabilidade e microbiológico durante os intervalos de 1, 7, 15, 30, 63, 90 e 135 dias. Amostras dos cremes formulados com as

concentrações correspondentes foram armazenadas em diferentes temperaturas, estufa a 35 ºC, ambiente a 25 ºC e geladeira a 4 ºC e analisados conforme a tabela 2 a seguir.

Tabela 2. Dados de estabilidade dos cremes vaginais.

DIA	ASPECTO			COR			ODOR			pH			MICROBIOLÓGICO		
	E	A	G	E	A	G	E	A	G	E	A	G	E	A	G
	B	2%	4%	B	2%	4%	B	2%	4%	B	2%	4%	B	2%	4%
1	NORMAL			NORMAL			NORMAL			7	6	5	SC	SC	SC
7	NORMAL			NORMAL			NORMAL			7	6	5	SC	SC	SC
15	NORMAL			NORMAL			NORMAL			7	6	5	SC	SC	SC
30	NORMAL			NORMAL			NORMAL			7	6	5	SC	SC	SC
63	NORMAL			NORMAL			NORMAL			7	6	5	SC	SC	SC
90	NORMAL			NORMAL			NORMAL			7	6	5	SC	SC	SC
135	NORMAL			NORMAL			NORMAL			7	6	5	SC	SC	SC

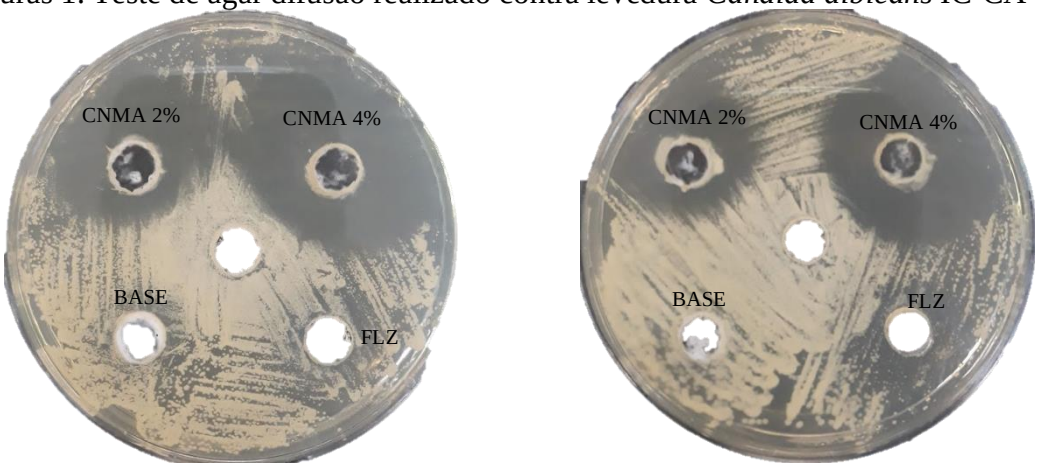
Legenda: E – Estufa; A – Ambiente; G – Geladeira; B – Creme base; 2% - Creme com 2% de cinamaldeído; 4% - Creme com 4% de cinamaldeído e SC – Sem crescimento.
Fonte: Autores (2024).

Os cremes não tiveram alterações, preservando as suas características organolépticas e sem contaminação por microrganismos, fator este presente devido ao uso de conservantes na formulação, já que o creme base, sem CNMA, também não teve contaminação e devido ao próprio CNMA, corroborando a pesquisa de Poczapski, Watanabe, Ferreira (2019).

Atividade antimicrobiana em ágar difusão

Os testes foram realizados em duplicatas no meio SDA contra *Candida* spp. de prospecção clínica. Os halos da atividade inibitória, conforme figura abaixo, dos cremes foram medidos em milímetros com um paquímetro.

Figuras 1. Teste de ágar difusão realizado contra levedura *Candida albicans* IC-CA-03.



Fonte: Autores (2024).

Após a medição de todos os halos indicadores de inibição contra todas as linhagens, estes dados foram compilados na tabela 3 a seguir.

Tabela 3. Medidas dos halos de inibição dos cremes vaginais após o teste de ágar difusão em diferentes temperaturas contra diferentes linhagens.

LEVEDURA			PLACA 1	PLACA 2	DESVIO PADRÃO
IC-CA-03 *C. albicans*	ESTUFA	2%	34 mm	42 mm	4
		4%	48 mm	48 mm	0
		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0
	AMBIENTE	2%	38 mm	36 mm	1
		4%	42 mm	44 mm	1
		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0
	GELADEIRA	2%	24 mm	26 mm	1
		4%	32 mm	38 mm	3
		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0
IC-CA-11 *C. albicans*	ESTUFA	2%	32 mm	30 mm	1
		4%	36 mm	42 mm	3
		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0
	AMBIENTE	2%	0 mm	0 mm	0
		4%	0 mm	0 mm	0
		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0
	GELADEIRA	2%	28 mm	26 mm	1
		4%	32 mm	32 mm	0
		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0
IC-CA-23 *C. albicans*	ESTUFA	2%	32 mm	32 mm	0
		4%	40 mm	40 mm	0
		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0
	AMBIENTE	2%	14 mm	26 mm	6
		4%	36 mm	38 mm	1
		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0
	GELADEIRA	2%	22 mm	30 mm	4
		4%	34 mm	32 mm	1
		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0
CFDS *C. glabrata*	ESTUFA	2%	22 mm	26 mm	2
		4%	27 mm	30 mm	15
		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0
	AMBIENTE	2%	16 mm	19 mm	15
		4%	26 mm	23 mm	15
		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0
	GELADEIRA	2%	26 mm	24 mm	1
		4%	27 mm	29 mm	1

		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0
	ESTUFA	2%	20 mm	26 mm	3
		4%	27 mm	29 mm	1
		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0
	AMBIENTE	2%	19 mm	16 mm	15
FJF *C. glabrata*		4%	22 mm	26 mm	2
		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0
	GELADEIRA	2%	16 mm	24 mm	4
		4%	24 mm	24 mm	0
		B	0 mm	0 mm	0
		F	0 mm	0 mm	0

Legenda: 2% – Creme com 2% de CNMA; 4% – Creme com 4% de CNMA e B – Creme base.
Fonte: Autores (2024).

O creme base, sem CNMA em sua composição, não teve atividade inibitória contra as linhagens clínicas, o mesmo ocorreu com o antifúngico fluconazol. Os cremes com CNMA, 2% e 4%, inibiram o crescimento de *Candida* spp. no seu entorno, notavelmente a espécie mais prevalente em casos clínicos, a *Candida albicans*, o que corrobora estudos recentes sobre o poder inibitório do CNMA sobre o seu crescimento, (Chen; *et al*., 2019, p. 9038, tradução nossa).

CONCLUSÃO

Os atuais casos de resistência das leveduras *Candida* aos fármacos antifúngicos, que são poucos disponíveis no mercado, estão enfatizando a necessidade de buscar novas substâncias bioativas promissoras para a solução disto. Com esta situação, recorre-se ao uso de óleos e extratos botânicos ainda não explorados para o desenvolvimento de novas formulações.

O cinamaldeído, usado nesta pesquisa, é uma substância bioativa com potencial para o tratamento da candidíase, conforme mostrado pelos resultados aqui obtidos que demonstram a capacidade antifúngica do composto e dos cremes de uso tópico formulados contendo CNMA, os quais se mostraram uma promessa alternativa para o tratamento da candidíase vulvovaginal.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Imunofisiologia, da UFMA, pela obtenção das linhagens para execução dos testes. Aos integrantes do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Bioprospecção e Biotecnologia, do IFMA, pelo apoio na execução da pesquisa, e ao

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo fomento à pesquisa.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Ministério da Saúde. **Farmacopeia Brasileira**. 6 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019, v. 1. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br. Acesso em: 29 fev. 2024.

CHEN, Lei *et al*. Cinnamaldehyde inhibits *Candida albicans* growth by causing apoptosis and its treatment on vulvovaginal candidiasis and oropharyngeal candidiasis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, p. 9037-9055, 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Tests for Determination of Yeast Susceptibility to Antifungal Therapy**. 3 ed. Pennsylvania: CLSI, 2008.

COUDRAY, Makella S.; MADHIVANAN, Purnima. Bacterial vaginosis—A brief synopsis of the literature. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 245, p. 143-148, 2020.

DE OLIVEIRA SANTOS, Giselle C. *et al*. *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1351, 2018.

DENNING, David W. *et al*. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. **The Lancet infectious diseases**, v. 18, n. 11, p. e339-e347, 2018.

POCZAPSKI, Claudia Christie; WATANABE, Silvana Harumi; FERREIRA, Elaine. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA IN VITRO DO CREME VAGINAL COM ÓLEO DE MELALEUCA FRENTE À *Candida albicans*. **Revista Renovare**, União da Vitória, v. 2, n. 1, p. 163-187, 30 jul. 2019. Semestral. Disponível em: https://book.ugv.edu.br/index.php/renovare/article/view/82. Acesso em: 27 mar. 2024.

RÉ, Ana Carolina S. *et al*. New perspectives on the topical management of recurrent candidiasis. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, p. 1568-1585, 2021.

SOBEL, Jack D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 214, n. 1, p. 15-21, 2016.