

## AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE PRÓPOLIS E GEL MUCOADESIVO CONTENDO PRÓPOLIS SOBRE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL EXPERIMENTAL

Gabriela Miranda Luiz Marasca Guerra (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Amanda Pohlmann Bonfim, Andressa Gimenes Braga, Damaris Fernandes Marçal da Silva, Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça, Erika Seki Kioshima Cótica, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (Orientador), e-mail: [terezinha.svidzinski@gmail.com](mailto:terezinha.svidzinski@gmail.com)

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

**Área e subárea:** Ciências Biológicas III, Microbiologia (Microbiologia Médica)

**Palavras-chave:** *Candida albicans*, antifúngico, Micologia Médica

### Resumo

A candidíase vulvovaginal (CVV), é um importante problema de saúde pública, que afeta um grande número de mulheres saudáveis em idade fértil resultando em grande desconforto, prejuízos nas relações sexuais e afetivas, além de prejudicar o desempenho laboral. É uma doença causada pelo crescimento anormal de fungos do tipo leveduras, que possuem uma ampla distribuição geográfica e estão associadas à microbiota normal na mucosa do trato genital feminino. Apesar da indústria farmacêutica ter investido e lançado novos antifúngicos nas três últimas décadas, o arsenal terapêutico disponível para o tratamento da CVV é bastante restrito. Produtos naturais como a própolis podem apresentar múltiplas ações terapêuticas, propriedades farmacêuticas, além do ponto de vista econômico. Sendo assim esse projeto propôs um tratamento de CVV por *Candida albicans* com o extrato de própolis (PES) incorporada em uma inovadora formulação farmacêutica. Os testes *in vitro* e *in vivo* com PES e também com a formulação de gel mucoadesivo a 16% (F16%) mostrou resultados satisfatórios, com atividade antifúngica semelhante ou até mais eficaz que o antifúngico de referência. É preciso ressaltar que F16% se destaca de forma complementar, por caracterizar-se como um gel mucoadesivo termoresponsivo, permitindo a permanência da formulação por mais tempo na mucosa vaginal. Dessa forma, estes resultados mostram-se relevantes e viabilizam estudos mais aprofundados para a busca de novas terapias para os casos de CVV.

### Introdução

Estima-se que os gastos com mulheres afetadas pela candidíase vulvovaginal (CVV) são de aproximadamente \$1bilhão/ano nos EUA (Foxman et al, 2000). Na Europa, as espécies de *Candida* estão listados como a causa principal causa das infecções vaginais. Já nos EUA e Brasil, a CVV é a segunda causa de infecção vaginal, sendo precedida somente da vaginose bacteriana (Foxman et al, 2013). Estima-se que aproximadamente 55.7% das mulheres adultas apresentem pelo menos um episódio em sua vida, sendo que destas, 5% atingirão o caráter recorrente (CVVR). Um obstáculo a ser superado é o tratamento da CVV e CVVR o qual é ainda limitado pela eficácia reduzida das drogas atualmente disponíveis; desenvolvimento de resistência; além do pequeno número de drogas antifúngicas disponível na atualidade. A Organização Mundial de Saúde tem incentivado a utilização de plantas como recurso para o tratamento de muitas doenças. Produtos naturais podem apresentar múltiplas ações terapêuticas, além de se constituírem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Neste sentido, o extrato de própolis (PES) é importante alternativa terapêutica do ponto de vista econômico e de eficácia farmacológica. Ela apresenta inúmeras propriedades farmacêuticas, incluindo atividade anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica (Dota et al., 2011; Pereira et al., 2011). PES é uma complexa mistura constituída por 47% de resina contendo vitaminas, sais minerais, compostos fenólicos como flavonóides, ácidos graxos, alcoóis aromáticos e ésteres; 30% de ceras; 5% de pólen, 4-15% de substâncias voláteis e matérias estranhas; e 13% de substâncias desconhecidas (Pereira et al., 2011). Entre estes componentes, os flavonoides estão presentes em altas quantidades, os quais serão identificados como sendo responsáveis pelas principais atividades farmacológicas deste composto. Pereira et al 2011, estudou as propriedades físico-químicas de um sistema (gel) mucoadesivo termoresponsivo contendo própolis. O grupo avaliou que este sistema teve eficiente atividade antifúngica *in vitro*, tornando essa formulação promissora para utilização em CVV, visto que traz o diferencial de ser de fácil administração e retenção na cavidade vaginal. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do extrato de própolis e de uma formulação farmacêutica contendo própolis em candidíase vulvovaginal experimental por *C. albicans*.

## Materiais e métodos

### *Micro-organismo*

Para o desenvolvimento do projeto, foi utilizado cepa padrão *C. albicans* ATCC 90028 estocadas à -80°C, na Micoteca do Laboratório de Micologia Médica, UEM.

### *Teste de sensibilidade antifúngica in vitro*

O teste de susceptibilidade da cepa padrão de *C. albicans* ao PES e ao gel termoativo+própolis foi realizado pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as normas de padronização publicadas nos documentos M27-

A3 do Clinical Laboratory Standards Institute. O extrato de própolis foi testado nas concentrações que variaram de 2680 a 5.23 µg/mL de polifenóis totais em ácido gálico. A formulação do gel termoativo+própolis foi testado nas concentrações de 2534.4 a 158.4 µg/mL de polifenóis totais em ácido gálico. A menor concentração capaz de induzir o crescimento da levedura testada, em relação ao controle positivo, foi identificada como a concentração fungicida mínima (CFM).

#### *Teste de susceptibilidade antifúngica in vivo*

A utilização de animais para o desenvolvimento da candidíase vulvovaginal experimental foi realizada sob aprovação do comitê de ética em animais CEUA nº 4717180616. Inicialmente os animais foram induzidas ao estado de pseudoestrato por uma solução de 17-valerato de β-estradiol (Sigma®, EUA) a 0.1 mg/animal semanalmente. Após 72h da primeira dose de estrogênio, *C. albicans* (2x10<sup>6</sup> UFC/mL) foi inoculado no canal vaginal de 5 grupo de animais, sendo: grupo controle (sem tratamento), grupo PES (tratado com PES, 32µg/animal de polifenóis totais em ácido gálico), grupo gel (tratado com a base do gel na ausência do PES), grupo gel+própolis (tratado com a formulação em gel incorporado com PES 152 µg/animal de polifenóis totais em ácido gálico) e grupo nistatina (tratado com 1.34mg/animal de nistatina). Os animais foram tratados durante 7 e 14 dias. Após esse período os animais foram eutanasiados com tiopental (100mg/kg) associada à lidocaína (10mg/kg) e, mediante técnicas cirúrgicas, o canal vaginal foi retirado macerado em tampão de lise para avaliação das unidades formadoras de colônias (UFC).

## Resultados e Discussão

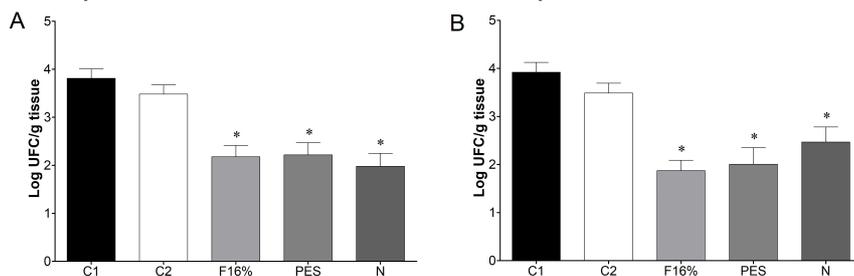
O tratamento da CVV é um desafio na prática clínica, e neste contexto novas alternativas terapêutica são reconhecidas, com destaque para aquelas de baixa toxicidade e custo acessível. Os resultados *in vitro* deste trabalho mostraram que que PES e o gel termoativo contendo própolis foi eficiente para a cepa padrão de *C. albicans* (tabela 1). Após o conhecimento da potencialidade do PES e incorporado a uma formulação como agente antifúngico *in vitro*, nosso próximo passo foi avaliar a atividade desses

**Tabela 1.** Concentração Inibitória Mínima do Extrato de Própolis e Gel termoativo contendo Própolis sobre *Candida albicans* ATCC 90028

<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Concentração Inibitória Mínima (CIM) µg/mL de polifenóis totais em ácido gálico	
	Extrato de Própolis (PES)	Gel termoativo+PES
	167.5	2534.4

compostos em modelo experimental *in vivo*. Após o estabelecimento da CVV, os animais foram tratados durante 7 dias (Fig. 1A) e 14 dias (Fig. 1B). Como avaliado na Figura 1, os resultados mostram que o PES teve atividade antifúngica eficiente sobre CVV experimental, reduzindo em aproximadamente 2log UFC a carga fúngica no tecido vaginal. Resultado semelhante foi observado para o gel termoativo contendo própolis (F16%).

Após 7 dias de tratamento houve redução aproximada de 1.5 logUFC na carga fúngica, valor semelhante a atividade antifúngica do extrato de própolis, confirmando que a formulação em gel mantém a atividade antifúngica do extrato, mesmo após incorporado à formulação. A Fig. 1B, mostra que PES e o gel termooativo mantiveram atividade antifúngica até o último ponto avaliado. Além disso, a redução na carga fúngica de ambos compostos testados foram semelhantes a nistatina, atualmente uma droga padrão para os casos de CVV não-complicada.



**Figura 1.** Eficácia do extrato de própolis e gel termooativo contendo própolis em modelo experimental de CVV. A) Grupo de animais tratados durante 7 dias B) Grupo de animais tratados durante 14 dias. C1: grupo infectado e não tratado, C2: grupo infectado e tratado com o gel termooativo na ausência do PES, F16%: gel termooativo com PES 16%, PES: extrato de própolis, N: Nistatina. \* $p < 0.05$ , *test t Student*, em comparação com C1.

## Conclusões

O gel mucoadesivo termoresponsivo contendo própolis (F16%) mostrou eficiente atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo*, sendo uma alternativa eficiente para os casos de CVV.

## Agradecimentos

Fundação Araucária

## Referências

Dota KF, Consolaro MEL, Svidzinski, TIE, Bruschi ML. **Antifungal Activity of Brazilian Propolis Microparticles against Yeasts Isolated from Vulvovaginal Candidiasis.** Evid Based Complement Alternat Med. 2011; 2011:201953.

Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD (2000) **Candida vaginitis:** self-reported incidence and associated costs. Sex Transm Dis 27: 230–235.

Foxman B, Muraglia R, Dietz JP, Sobel JD, Wagner J (2013) **Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States:** results from an internet panel survey. J Low Genit Tract Dis 17: 340–345.

Pereira, RRA; Bruschi, ML. **Vaginal mucoadhesive drug delivery systems.** Drug Development and Industrial Pharmacy (Print), v. 38, p. 643-652, 2012.