

**UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA  
CURSO DE FARMÁCIA**

Paula Carine Müller

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPRODUTO DE USO TÓPICO VAGINAL  
CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* PARA O TRATAMENTO  
DA CANDIDÍASE VAGINAL**

Santa Cruz do Sul  
2022

Paula Carine Müller

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPRODOTO DE USO TÓPICO VAGINAL  
CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* PARA O TRATAMENTO  
DA CANDIDÍASE VAGINAL**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação  
em Farmácia apresentado à Universidade de  
Santa Cruz do Sul para obtenção do título de  
Bacharel em Farmácia

Orientadora: Dra. Chana de Medeiros da Silva  
Coorientadora: Dra. Jane Dagmar Pollo Renner

Santa Cruz do Sul  
2022

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer as pessoas que sempre estiveram do meu lado durante toda essa jornada da graduação, por aguentarem firme comigo, e não abandonarem nos momentos mais estressante, exaustivos e agoniantes que acabam surgindo ao longo dessa jornada, porque não é fácil, e foram eles meus pais, minha família e os amigos de verdade. A vontade de desistir em algum momento surge, e lá estão eles, nos impulsionando a seguir a batalha e com certeza foi por essas pessoas que acreditam em mim que me fizeram chegar até aqui.

Agradeço a minha orientadora Chana de Medeiros da Silva e minha coorientadora Jane Dagmar Pollo Renner que me orientaram durante esse último ano neste trabalho de conclusão de curso, e não mediram esforço para que eu pudesse realizar essa pesquisa e me deram todo o suporte necessário. Agradeço também todos os colaboradores do bloco 20, por me auxiliarem nas práticas experimentais e sempre se manterem dispostos a ajudar, a nossa farmacêutica Daiane Milbrandt Rosa responsável pelos laboratórios do bloco 35, que foi essencial nesse processo, sempre muito prestativa. E não poderia esquecer do secretário do curso Jorge, que me aguentou durante esse último semestre e que sempre me proporcionava um cafezinho da coordenação.

Gostaria de agradecer também a Universidade de Santa Cruz do Sul, a todos os professores do curso e demais funcionários que de alguma forma contribuíram para a construção do conhecimento ao longo da graduação.

## RESUMO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção fúngica vaginal comum, o principal agente etiológico é a *Candida albicans*, comumente caracterizada pela coceira vulvar, queimação, dor ao urinar e corrimento vaginal. A prevalência mundial e os dados epidemiológicos são raros e imprecisos porque são, em sua maioria, obtidos a partir de autorrelatos e diagnósticos do médico geral local. Existe um amplo espectro de fatores que podem predispor a doença, como diabetes mellitus tipo 2, regimes de imunossupressão, terapia com antibióticos, fatores comportamentais, como o uso de contraceptivos orais e dispositivos intrauterinos. O diagnóstico geralmente é feito clinicamente, baseado nos sinais e sintomas apresentados pela paciente, o tratamento na grande maioria dos casos é realizado somente em pacientes sintomáticas. Usualmente a terapia medicamentosa utilizada são antifúngicos azólicos, tanto de forma oral como tópica, apesar de serem eficazes, com o passar dos anos passaram a apresentar resistência. Por esse motivo, esse projeto tem como objetivo comprovar a atividade antifúngica de um bioproduto tópico intravaginal desenvolvido a partir do óleo essencial de *Origanum vulgare* com componentes naturais que não seja tão agressivo como o tratamento convencional aos indivíduos que possuem candidíase vaginal. O óleo essencial foi avaliado por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM), apresentando seus principais constituintes conforme encontrado na literatura, os óvulos foram analisados quanto as características organolépticas, físico-química e a análise da ação antifúngica. Após optar pela base graxa Novata®, que apresentou melhores vantagens como rapidez na produção, melhor apresentação e sem a necessidade de incorporar conservantes. A ação antifúngica foi analisada pelo método disco-difusão em ágar, obteve resultados satisfatórios em relação ao OEO, o bioproduto e ao fluconazol. Apesar do bioproduto apresentar resultado sensível contra cepas de *Candida albicans*, é necessário a realização de novos testes in vitro e in vivo, contra outras espécies de *Candida*, testes de citotoxicidade e caso necessário a troca de base.

**Palavras-chave:** Candidíase; Óvulo vaginal; Óleo Essencial de Orégano;

## ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a common vaginal fungal infection, the main etiologic agent is *Candida albicans*, commonly characterized by vulvar itching, burning, painful urination and vaginal discharge. Worldwide prevalence and epidemiological data are rare and imprecise because they are mostly obtained from self-reports and diagnoses by the local general practitioner. There is a wide spectrum of factors that can predispose the disease, such as type 2 diabetes mellitus, immunosuppression regimens, antibiotic therapy, behavioral factors such as the use of oral contraceptives and intrauterine devices. The diagnosis is usually made clinically, based on the signs and symptoms presented by the patient, treatment in the vast majority of cases is performed only in symptomatic patients. Usually the drug therapy used are azole antifungals, both orally and topically, despite being effective, over the years they started to show resistance. For this reason, this project aims to prove the antifungal activity of an intravaginal topical bioproduct developed from the essential oil of *Origanum vulgare* with natural components that is not as aggressive as the conventional treatment to individuals who have vaginal candidiasis. The essential oil was evaluated by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS), presenting its main constituents as found in the literature, the eggs were analyzed for organoleptic, physicochemical and antifungal action. After opting for the Novata® grease base, which presented better advantages such as speed in production, better presentation and without the need to incorporate preservatives. The antifungal action was analyzed by the disk-diffusion method in agar, obtaining satisfactory results in relation to OEO, the bioproduct and fluconazole. Although the bioproduct presents sensitive results against strains of *Candida albicans*, it is necessary to carry out new tests in vitro and in vivo, against other *Candida* species, cytotoxicity tests and, if necessary, the exchange of base.

**Keywords:** Candidiasis; Vaginal egg; Oregano Essential Oil;

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>8</b>
2.1 Objetivo geral .....	8
2.2 Objetivos específicos .....	8
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>9</b>
3.1 Candidíase vulvovaginal.....	9
3.2 Opções terapêuticas .....	10
3.3 Óleo essencial de Origanum vulgare .....	15
3.4 Formas farmacêuticas de uso ginecológico .....	17
<b>4 MATERIAIS E METODOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 Tipo de estudo.....	20
4.2 Local do estudo.....	20
4.3 Procedimentos metodológicos .....	20
4.4 Matéria prima vegetal.....	21
4.5 Caracterização fitoquímica .....	21
4.6 Desenvolvimento da formulação .....	22
4.7 Avaliação organoléptica e físico-química das formulações .....	22
4.8 Análise Antifúngica do bioproduto .....	23
4.9 Análise dos dados .....	24
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>25</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXO A – RELATÓRIO DE ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA DO OEO.....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção fúngica oportunista, considerada a segunda causa mais comum de vaginite entre as mulheres, é causada por espécies do gênero *Candida*, com prevalência de 80% a 92% dos casos por *Candida albicans* e o restante pelas demais espécies não *albicans* (*Candida glabrata* e *Candida tropicalis*). Estima-se que em torno de 75% de todas as mulheres durante sua vida reprodutiva em algum momento são acometidas por essa infecção, dessas 50% terão dois ou três episódios durante a sua vida, e 5-8% delas sofrem de candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), quando ocorre  $\geq 4$  episódios por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; SANCHES et al., 2020; SOBEL, 1985).

Os principais sinais e sintomas da CVV são coceira, queimação, vermelhidão, corrimento vaginal espesso esbranquiçado, com aspecto de queijo cottage, dor durante relação sexual, dor e secreção vaginal. Os fatores mais comuns que predisõem a doença é o uso de antibióticos, relação sexual, gravidez, uso de contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal, clima úmido, diabetes *mellitus* descompensada e infecção por HIV (CARVALHO et al., 2021; GONÇALVES et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; YANO et al., 2019).

O diagnóstico envolve o exame clínico ginecológico baseado nos sinais e sintomas da paciente, devendo ser submetidas à avaliação padrão com medida do pH vaginal, teste de microscopia com hidróxido de potássio (KOH) a 10% (CARVALHO et al., 2021; FREITAS et al., 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; SOBEL, 1985).

O tratamento para candidíase é indicado geralmente para o alívio das pacientes que referem sintomas e varia conforme a gravidade, podendo ser por via oral, vaginal e/ou tópica. Durante algumas décadas a Anfotericina B foi o único fármaco antifúngico para uso sistêmico, altamente efetivo em diversas infecções graves, porém apresentava problemas devido a sua toxicidade. As doenças fúngicas vivenciaram uma transformação com a inserção dos fármacos azóis aparentemente atóxicos, tais como cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Os fármacos antifúngicos azóis se destacam pelo seu amplo espectro de ação, por sua biodisponibilidade oral e por apresentarem baixa toxicidade, porém, com o passar dos anos começaram a surgir resistência aos antifúngicos azólicos em espécies que antigamente eram sensíveis, como é o caso da *Candida albicans* (GOODMAN; GILMAN, 2003; KARTZUNG et al., 2014).

A administração vaginal é utilizada para alcance do efeito local e sistêmico. A ação local possibilita menores doses de fármaco, com baixa absorção e distribuição sistêmica e assim apresentando menor toxicidade (AULTON; TAYLOR, 2016). Desta maneira, se destacam os métodos de tratamento alternativos e complementares, como o uso de produtos naturais, uma fonte promissora são os compostos bioativos com atividade antifúngica para tratamento de infecções vaginais, principalmente em casos de hipersensibilidade e resistência dos patógenos aos antimicrobianos convencionais (FELIX; RÖDER; PEDROSO, 2019; KARAMAN et al., 2017).

O óleo essencial de orégano é um derivado volátil da planta *Origanum vulgare* L., é largamente empregada como especiaria culinária e utilizada na medicina tradicional no manejo de distúrbios digestivos, respiratórios e dermatológicos (LOMBREA et al., 2020; SHARIFI-RAD et al., 2021). É composto principalmente por moléculas de natureza terpênica, monoterpenos e sesquiterpenos (ONIGA et al., 2018). Esses compostos desempenham inúmeras propriedades farmacológicas e terapêuticas já evidenciadas na prática clínica, como atividades antimicrobianas, antivirais e antifúngicas (BROCHOT et al., 2017).

Com base nas evidências já referenciadas de resistências dos microrganismos a determinados antifúngicos e a toxicidade dos mesmos, o presente trabalho visa desenvolver um bioproduto de uso tópico vaginal com óleo essencial de *Origanum vulgare* que apresente atividade antifúngica para tratamento de candidíase vaginal.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver um bioproduto de uso tópico com óleo essencial de *Origanum vulgare* que apresente atividade antifúngica para tratamento de candidíase vaginal.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a composição fitoquímica do óleo essencial de *Origanum vulgare* a ser utilizado no desenvolvimento da formulação;
- Desenvolver uma formulação intravaginal contendo óleo essencial de *Origanum vulgare* e outros ativos naturais;
- Avaliar as características organolépticas e físico-químicas da formulação antifúngica contendo óleo essencial de *Origanum vulgare*;
- Analisar a atividade antifúngica *in vitro* do bioproduto contendo óleo essencial de *Origanum vulgare*.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Candidíase vulvovaginal

A Candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção fúngica oportunista prevalente na mucosa genital, comprometendo principalmente a vulva e a vagina, causada por leveduras do gênero *Candida*. A *Candida* é um microrganismo dimórfico, reside como comensal, fazendo parte da microbiota normal dos indivíduos saudáveis. Porém, sob determinadas condições causa a ruptura do balanço normal da microbiota e o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies do gênero *Candida* tendem a manifestações agressivas, tornando-se patogênicas. A origem pode ser endógena, quando oriunda da microbiota ou exógena, apesar de não ser considerada uma infecção sexualmente transmissível, podendo ser desencadeada pela relação sexual pelo contato com o esperma, que apresenta pH elevado, contribuindo para o desequilíbrio da microbiota vaginal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; SANCHES et al., 2020).

As principais manifestações clínicas associadas à vaginite são coceira, queimação, vermelhidão, corrimento vaginal espesso esbranquiçado, com aspecto de queijo cottage, dor durante relação sexual, dor vaginal e secreção vaginal. Os fatores mais comuns que predispoem a doença são: o uso de antibióticos, relação sexual, gravidez, uso de contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal, clima úmido, diabetes *mellitus* descompensada, uso de corticoides, imunossupressores ou quimio e radioterapia, imunodeficiência, contato com substâncias alergênicas e irritantes, infecção por HIV, higiene pessoal e vestimentas que colaborem no aumento da umidade e calor local, o que pode propiciar um ambiente ideal para fungos (CARVALHO et al., 2021; GONÇALVES et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020 YANO et al., 2019).

O diagnóstico da vulvovaginite fúngica envolve o exame clínico ginecológico baseado nos sinais e sintomas da paciente, como principal queixa, leucorreia branca, na maioria dos casos acompanhada de intenso prurido, eritema e em alguns casos apresentam ainda edema, devendo ser submetidas à avaliação padrão com medida do pH vaginal, teste de *Whiff*, microscopia a fresco e com hidróxido de potássio (KOH) a 10%. No exame microscópico a fresco 40 a 60% dos casos apresentam a presença de hifas e pseudo-hifas conforme mostrado na figura 1, geralmente encontradas na

fase sintomática da infecção. O diagnóstico final é realizado após a investigação da história clínica da paciente, fornecendo informações sobre a prática sexual, higiene pessoal e outros fatores que podem predispor a patologia. A candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) é definida quando a paciente reporta quatro ou mais episódios sintomáticos de CVV em um ano, geralmente está associado a outros fatores de risco (CARVALHO et al., 2021; FREITAS et al., 2011; HOFFMAN et al., 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; SOBEL, 1985).

O principal agente etiológico causador da CVV é *C. albicans* prevalente em 80% a 92% dos casos; e no restante às demais espécies não *albicans* (*Candida glabrata*, *Candida tropicalis*) com menor índice de prevalência. Cerca de 10% a 20% das mulheres durante toda a vida reprodutiva serão colonizadas por *Candida ssp.* de forma assintomática, não necessitando de tratamento, uma vez que a levedura pode fazer parte da microbiota vaginal (BLOSTEIN, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

**Figura 1** - Microscopia da presença de hifas de *Candida albicans*



Fonte: Hoffman e colaboradores 2014.

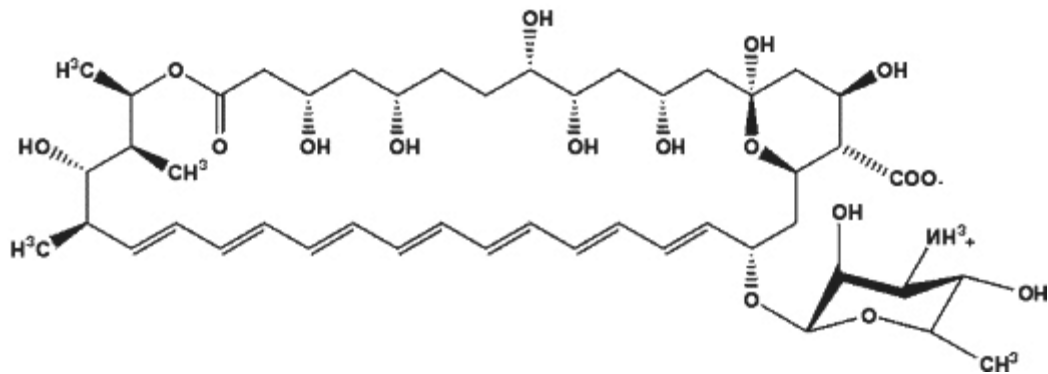
### 3.2 Opções terapêuticas

O tratamento para candidíase é indicado geralmente para o auxílio das pacientes que referem sintomas, sendo que o tipo de tratamento varia conforme o grau de gravidade, podendo ser por via oral (dose única, 5 ou 7 dias) ou tópica de 3 a 14 dias. Alguns estudos randomizados foram feitos e obtiveram um índice elevado de cura, em ambas vias de administração, excedendo 90% (PAPPAS et al., 2009).

Os tratamentos de dose única e curta duração de até 7 dias são indicados para casos considerados não complicados, de intensidade baixa a moderada, para episódios únicos, isolados e não recorrentes. Nesses casos o índice de cura é de 89 a 90%. Os esquemas de tratamento com duração > 7 dias geralmente são prescritos em casos de candidíase vulvovaginal complicadas (severa, aguda ou recorrente) (PAPPAS et al., 2009).

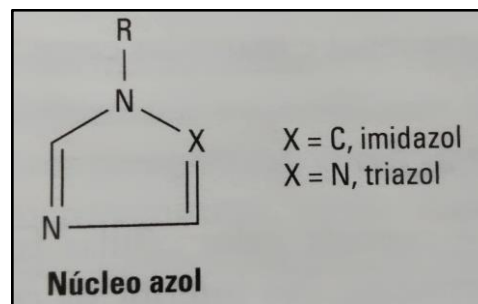
Durante algumas décadas a Anfotericina B foi o único fármaco antifúngico disponível para uso sistêmico, ainda que altamente efetiva em diversas infecções graves, também é bastante tóxica. A farmacoterapia das doenças fúngicas vivenciou uma transformação com a inserção dos fármacos azóis aparentemente atóxicos (formulações orais e endovenosa) e das equinocandinas (somente endovenosa). Os fármacos antifúngicos azólicos se destacam pelo seu amplo espectro de ação, por sua biodisponibilidade oral e por apresentar baixa toxicidade, porém, com o passar dos anos começaram a surgir resistência aos antifúngicos azólicos em espécies que antigamente eram sensíveis, como é o caso da *Candida albicans* (GOODMAN; GILMAN, 2003; KARTZUNG et al., 2014).

A anfotericina B é um macrolídeo poliênicos, possui 7 duplas ligações conjugadas e uma micosamina ligada ao anel principal por uma ligação glicosídica conforme mostra a Figura 2. Devido a presença de um grupo carboxila no anel principal e de um grupo amino primário na micosamina, se torna hidrossolúvel em valores muito extremos de pH. No mecanismo de ação, a atividade antifúngica da Anfotericina B acontece pela ligação a um grupo esterol, em especial ao ergosterol, encontrado na membrana de fungos sensíveis. Os agentes poliênicos formam poros ou canais, devido a interligação com esteróis das membranas celulares, resultando no aumento da permeabilidade da membrana, causando o extravasamento de algumas moléculas pequenas. (GOODMAN; GILMAN, 2003; KARTZUNG et al., 2014).

**Figura 2 – Estrutura química da Anfotericina B.**

Fonte: Goodman & Gilman, 2003.

Os antifúngicos azólicos compõem dois subgrupos: os imidazólicos e os triazólicos. Possuem o mesmo espectro antifúngico e o mesmo mecanismo de ação. Os triazóis orais são o itraconazol e fluconazol, e o cetoconazol um imidazólico. São classificados de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azol de cinco membros, conforme mostra a Figura 3 (GOODMAN; GILMAN, 2003; KARTZUNG et al., 2014; RANG et al., 2016)

**Figura 3 - Estrutura das moléculas dos fármacos azóis.**

Fonte: Katzung e colaboradores, 2014.

O mecanismo de ação de ambos resulta na diminuição da síntese do ergosterol, devido a inibição das enzimas do citocromo P450 fúngicas, envolvendo algumas funções dos sistemas enzimáticos relacionados à membrana, como o ATPase e as enzimas responsáveis pelo transporte de elétrons, assim bloqueando o crescimento do fungo. Os azóis apresentam toxicidade seletiva, devido sua menor afinidade com as enzimas citocromo P450 humanas e maior afinidade com as enzimas fúngicas. Os imidazóis possuem maior incidência de interações medicamentosas e efeitos adversos, do que os triazóis, por serem menos seletivos. A resistência aos

antifúngicos azóis ocorre por múltiplos mecanismos, que surgiram gradualmente durante o seu uso prolongado e pelo uso crescente para profilaxia. (GOODMAN; GILMAN, 2003; KARTZUNG et al., 2014; RANG et al., 2016).

O índice de cura com a utilização do fluconazol 150 mg administrado por via oral, em 2 doses com intervalo de 72 horas é de 85% (FREITAS et al., 2011). Os fármacos cetoconazol, fluconazol e itraconazol são usados no tratamento por via oral, apresentando eficácia similar à terapia com agentes tópicos no tratamento da CVV, porém, apresentam toxicidade sistêmica que precisa ser controlada. (FERRIANI; VIEIRA; BRITO, 2015). Esses fármacos podem apresentar algumas interações medicamentosas, as principais são com os antagonistas do canal de cálcio, cisaprida, astemizol, cumarínicos, hipoglicemiantes orais, rifampicina, fenitoína e ciclosporina. Em alguns casos podem ocasionar sintomas gastrintestinais, cefaléia e em uso prolongado hepatotoxicidade. No tratamento em gestantes é contraindicada a terapia com antifúngicos orais, devido aos riscos de causar anomalia ou danos ao feto (ACOG, 2006; HOFFMAN, 2014; WORKOWSKI; BERMAN, 2006).

Todavia, pacientes com casos de vulvovaginites fúngicas recorrentes precisam de tratamento continuado entre os episódios com antifúngicos orais. Neste sentido, tanto o cetoconazol 100mg/diário, quanto o fluconazol 150mg/semanalmente, tomados durante seis meses são opções eficazes na redução da frequência de episódios, entretanto, apresentam risco de toxicidade e interação com outros fármacos (LOPES, 2015; WORKOWSKI; BERMAN, 2006).

Os fármacos de forma farmacêutica tópica também apresentam eficácia para CVV, dentre estes os azólicos são mais efetivos, comparado com o uso da nistatina. Em pacientes com doenças crônicas como diabetes ou infecção vaginal por *Candida* não *albicans*, os tratamentos por via tópica geralmente são mais extensos entre 10 e 14 dias em associação à terapia oral (ACOG, 2006; WORKOWSKI; BERMAN, 2006).

A terapia antifúngica tópica apresenta alguns fármacos disponíveis, dentre eles a nistatina, um macrolídeo poliênico similar à anfotericina B. É empregada somente na forma tópica devido sua toxicidade. A nistatina é sensível contra grande parte de organismo do tipo *Candida*, sendo utilizada no tratamento de candidíase vaginal. Outra classe de antifúngicos amplamente utilizada são os azóis tópicos, subdivididos em imidazólicos que podemos destacar o clotrimazol, isoconazol, miconazol e o tioconazol, e triazólico representado pelo terconazol (HARDMAN; LIMBIRD, 2003; KARTZUNG et al., 2014; RANG et al., 2016)

A tabela a seguir apresenta uma síntese dos principais medicamentos utilizados comercialmente no tratamento da CVV, sua via de administração e duração do tratamento (Tabela 1).

**Tabela 1** - Esquema de tratamentos para CVV.

<b>Tratamento da candidíase vulvovaginal</b>		
<b>Medicamento (apresentação)</b>	<b>Via de administração e dosagem</b>	<b>Duração</b>
<b>Primeira Opção</b>		
Miconazol creme 2%	Via vaginal, 5 g/dia	7 dias
Clotrimazol creme 1%	Via vaginal, 5 g/dia	6 – 12 dias
Clotrimazol óvulo	Via vaginal, 100 mg/dia	7 dias
Tioconazol creme 2%	Via vaginal, 5 g/dia	3 dias
Tioconazol creme 6,5%	Via vaginal, 5 g/dia	1 dia
Tioconazol óvulo	Via vaginal, 300 mg/dia	1 dia
<b>Segunda Opção</b>		
Fluconazol cp 150 mg	VO, 1 cp	Dose única
Itraconazol cp 200 mg	VO, 1 cp. 12/12 h	1 dia
Cetoconazol cp 400 mg	VO, 1 cp / dia	5 dias
<b>Situações Especiais: Gestação, Amamentação</b>		
Miconazol creme 2%	Via vaginal, 5 g/dia	7 dias
Clotrimazol creme 1%	Via vaginal, 5 g/dia	6 – 12 dias
Clotrimazol óvulo	Via vaginal, 100 mg/dia	7 dias
Nistatina	Via vaginal, 100.000 unidades/dia	14 dias
Terconazol creme	Via vagina, 5 g/dias	5 dias
Isoconazol creme 1%	Via vagina, 5 g/dias	7 dias
Isoconazol óvulo	Via vaginal, 600 mg/dia	Dose única
<b>Recorrências e Profilaxia</b>		
Fluconazol cp 150 mg	VO, 1 cp	6 meses
Cetoconazol cp 400 mg	VO, 1 cp / dia	6 meses
Ácido bórico cápsula gelatinosa 600mg	Via vaginal, 1 cápsula/dia	7-14 dias

Legenda: cp: comprimidos; VO: via oral.

Fonte: Adaptado de Freitas e colaboradores, 2011.

Yassin e colaboradores (2020) realizaram um estudo sobre a resistência de cepas de *C.albicans*, *C.tropicalis* e *C. glabrata* aos antifúngicos comuns, usando 394 amostras de esfregaços vaginais, coletados no Laboratório Regional em King Saud Medical City entre junho de 2016 a julho de 2018. Entretanto, cerca de 205 amostras positivaram para vaginite, *Candida* foi a principal causa de infecções vaginais (58,5%), seguida por vaginose bacteriana (41%) e infecções por tricomoníase (0,5%). Diante disso, foram usadas cepas de *C.albicans* para realização do teste de sensibilidade antifúngica, utilizando os fármacos itraconazol e terbinafina. O resultado apresentou alta sensibilidade, porém, resistência aos fármacos clotrimazol, fluconazol e nistatina. *C. tropicalis* expressou resistência à nistatina, entretanto, foi sensível ao clotrimazol, fluconazol e a terbinafina, apresentando ter sensibilidade dependente da dose ao itraconazol. *C. glabrata* manifestou resistência a todos os antifúngicos usados no estudo.

Neste contexto, os métodos de tratamento alternativos e complementares, como o uso de produtos naturais, se destacam como uma fonte promissora de compostos bioativos com atividade antifúngica para tratamento de infecções vaginais, principalmente em casos de hipersensibilidade e resistência dos patógenos aos antimicrobianos convencionais. Essa demanda por produtos minimalistas, ecologicamente corretos, sustentáveis e biodegradáveis é cada vez mais relevante, principalmente quando apresentam menos efeitos colaterais, melhor tolerabilidade, eficácia e aceitabilidade (FELIX; RÖDER; PEDROSO, 2019; KARAMAN et al., 2017).

### **3.3 Óleo essencial de *Origanum vulgare***

O óleo essencial de orégano (OEO) é um derivado volátil da planta *Origanum vulgare* L., uma erva aromática perene, membro da família *Lauraceae* e gênero *Origanum*, que compreende aproximadamente 3 grupos, 10 seções, 38 espécies, 6 subespécies e 17 híbridos, botanicamente caracterizados por uma larga diversidade morfológica e química. Originária das regiões do mediterrâneo, mas amplamente distribuída e cultivada em países da Europa, África, Ásia e América, é uma planta herbácea largamente empregada como especiaria culinária e utilizada na medicina tradicional no manejo de distúrbios digestivos, respiratórios e dermatológicos (Figura 4) (LOMBREA et al., 2021; SHARIFI-RAD et al., 2020).



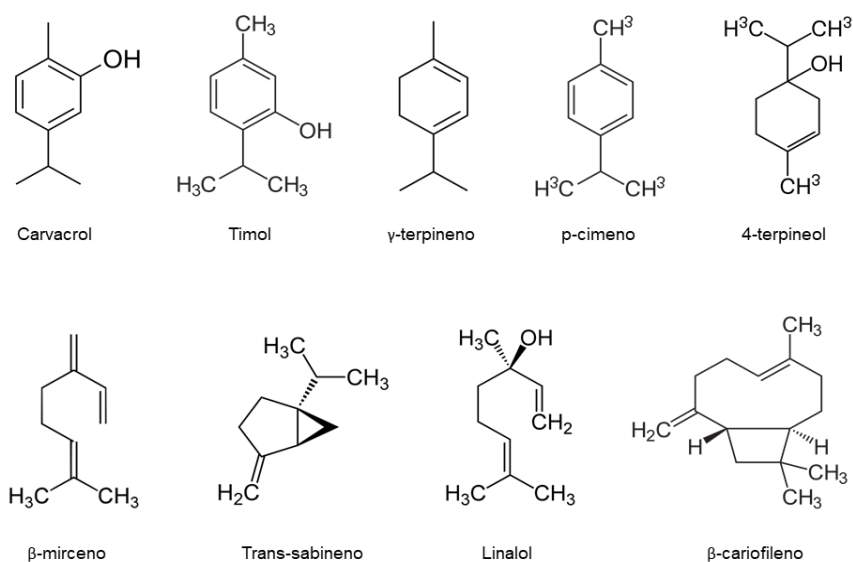
**Figura 4** – Imagem das partes aéreas de *Origanum vulgare L.*



**Fonte:** Lombrea e colaboradores, 2020.

Dentre os metabólitos secundários naturais, o óleo essencial representa 1 a 3% do conteúdo total da planta, podendo ser extraído das partes aéreas onde são biossintetizados em tricomas glandulares peltados, por meio dos métodos tradicionais de hidrodestilação, arraste a vapor, prensagem e extração com solventes (HRNČIČ et al., 2020; MORSHEDLOO et al., 2018). Este óleo é composto principalmente por moléculas de natureza terpênica, monoterpenos e sesquiterpenos, sendo que dentre os mais representativos estão carvacrol, timol, p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno,  $\beta$ -mirceno, 4-terpineol, *trans*-sabineno,  $\beta$ -cariofileno e linalol (Figura 5) (ONIGA et al., 2018).

**Figura 5** - Constituintes majoritários do óleo essencial de orégano.



**Fonte:** Adaptado de Hrnčič e colaboradores (2020).

Esses compostos desempenham inúmeras propriedades farmacológicas e terapêuticas já evidenciadas na prática clínica, como atividades antimicrobianas, antivirais e antifúngicas (BROCHOT et al., 2017) anti-inflamatórias e cicatrizantes (AVOLA et al., 2020) antioxidantes (KOSAKOWSKA et al., 2020), antiproliferativas e antimutagênicas (BEGNINI et al., 2014), neuroprotetoras e hepatoprotetoras (SHARIFI-RAD et al., 2020), antiparasitárias, antidiabéticas, analgésicas e antipiréticas, (BOUYAHYA et al., 2020), configurando o óleo como recurso natural, alternativo e funcional de aplicabilidade industrial nas áreas farmacêutica, cosmética e alimentícia (ASSIRI et al., 2015).

Ensaio de atividade antifúngica empregando o óleo essencial de orégano no tratamento de amostras de diferentes espécies de *Candida* que causam infecções ginecológicas, demonstram resultados de susceptibilidade promissores, superiores aos fármacos utilizados em protocolos de tratamento padrão, como fluconazol e nistatina (KARAMAN et al., 2017; MANDRAS et al., 2021). Seu mecanismo de ação antifúngica, ainda não totalmente elucidado, está amplamente atribuído à alteração da homeostase celular e rompimento da membrana fúngica, interferindo no desenvolvimento de estruturas morfológicas ligadas à patogenicidade das leveduras pela inibição da esporulação e brotamento de fungos (NAZZARO et al., 2017).

No entanto, as propriedades biológicas do óleo essencial de orégano estão diretamente relacionadas à sua composição fitoquímica, a qual pode ser amplamente afetada e influenciada por fatores, intrínsecos e extrínsecos, referentes às suas espécies vegetais e cultivares, características taxonômicas, condições do solo e cultivo, localização geográfica de desenvolvimento da planta, condições climáticas e de crescimento, manejo do solo e de pragas, época de colheita, região anatômica utilizada, métodos de extração e técnicas de secagem, assim como circunstâncias de armazenamento e procedimentos de conservação do material vegetal (LEYVA-LÓPEZ et al., 2017; SOLTANI et al., 2021).

### **3.4 Formas farmacêuticas de uso ginecológico**

Apesar da via oral ser uma das formas de administração de fármacos mais convencional, existem vias alternativas como a via vaginal, apresentando algumas vantagens, quando um paciente é incapaz de utilizar a via oral, evitando algumas reações adversas principalmente relacionada a problemas gastrointestinais, pessoas

com algum tipo de deficiência, problemas de deglutição ou pelo sabor desagradável de certos fármacos, apresentam benefícios em tratamento com ação local, de fácil manipulação e aplicação (AULTON; TAYLOR, 2016).

A administração vaginal é utilizada para alcance do efeito local e sistêmico, mesmo que o efeito local seja mais comum por essa via. A ação local possibilita menores doses de fármaco, com baixa absorção e distribuição sistêmica e assim apresentando menor toxicidade. Incluem alguns fármacos antifúngicos como clotrimazol, miconazol, isoconazol e terconazol. Dentre as formas farmacêuticas vaginais, podemos destacar os óvulos, pomadas, comprimidos e os cremes. Os óvulos são formulações sólidas, de inserção vaginal, geralmente de dose única, gerando grande interesse por favorecer assim a adesão ao tratamento. São preparados em diversos formatos, usualmente ovóide, havendo consistência necessária para ser inserido na vagina. Podem conter um ou mais princípios ativos dissolvidos ou dispersos em uma base adequada, fundem em temperatura corporal (AULTON; TAYLOR, 2016).

A incorporação de óleos essenciais em formas farmacêuticas ainda é um desafio farmacotécnico devido à sua volatilidade, solubilidade, oxidação e estabilidade. Além disso, a adição de OE em formulações pode gerar diversas incompatibilidades com os componentes da formulação, resultando em instabilidades físico-químicas. Neste contexto, as formulações semissólidas são as mais adequadas para a incorporação de óleos essenciais, entretanto a análise de sua estabilidade é de extrema importância (ISAAC et al., 2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou um Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos sugerindo parâmetros de avaliação e testes de estabilidade para produtos cosméticos e dermatológicos, ressaltando a necessidade de assegurar a qualidade da formulação, desde a fabricação até a expiração do prazo de validade (BRASIL, 2004). Um dos grandes desafios no desenvolvimento de óvulos é a estabilidade, que pode ser afetada por fatores externos, como a temperatura, luz, oxigênio, umidade, material de acondicionamento e microrganismos; e a fatores intrínsecos, que podem estar relacionados a incompatibilidades físicas (como inversão de fases, coalescência) e incompatibilidade química (pH, reações de óxido-redução, interação entre os ingredientes da formulação e o material de acondicionamento) (ISAAC et al., 2008).

O controle de qualidade, segurança e eficácia das formulações vaginais são feitas por testes *in vitro* e *in vivo*. Sendo necessário avaliar alguns parâmetros como as características organolépticas (cor, forma, odor e superfície), características de liberação do princípio ativo (fusão e solubilidade), estabilidade (pH e resistência mecânica) e a determinação do peso médio (AULTON; TAYLOR, 2016; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

## **4 MATERIAIS E METODOS**

### **4.1 Tipo de estudo**

A pesquisa caracterizou-se como um estudo analítico experimental de caráter qualitativo, realizado em escala laboratorial, para que futuramente possa ser testado em seres humanos, visando o desenvolvimento de um bioproduto de uso tópico intravaginal com óleo essencial de *Origanum vulgare* para tratamento de candidíase vaginal.

### **4.2 Local do estudo**

A caracterização fitoquímica do óleo essencial de orégano e o desenvolvimento farmacotécnico do bioproduto, bem como análise da estabilidade da formulação desenvolvida foram realizados, respectivamente, no laboratório de cromatografia do curso de Química e nos laboratórios de manipulação magistral e de controle de qualidade do curso de Farmácia. A análise antifúngica da formulação desenvolvida foi realizada no Laboratório de microbiologia, no bloco 20 da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC).

### **4.3 Procedimentos metodológicos**

- 1ª etapa: realizada a revisão bibliográfica do tema da pesquisa;
- 2ª etapa: determinação da metodologia aplicada;
- 3ª etapa: planejamento e elaboração da composição da formulação;
- 4ª etapa: avaliação da composição fitoquímica do óleo de orégano;
- 5ª etapa: avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de orégano;
- 6ª etapa: desenvolvimento do bioproduto em escala magistral;
- 7ª etapa: avaliação da atividade antifúngica do bioproduto;
- 8ª etapa: avaliação das características organolépticas e físico-químicas do bioproduto
- 9ª etapa: análise e discussão dos resultados coletados na pesquisa;
- 10ª etapa: elaboração da versão final do trabalho de conclusão de curso;
- 11ª etapa: apresentação do trabalho para banca avaliadora.

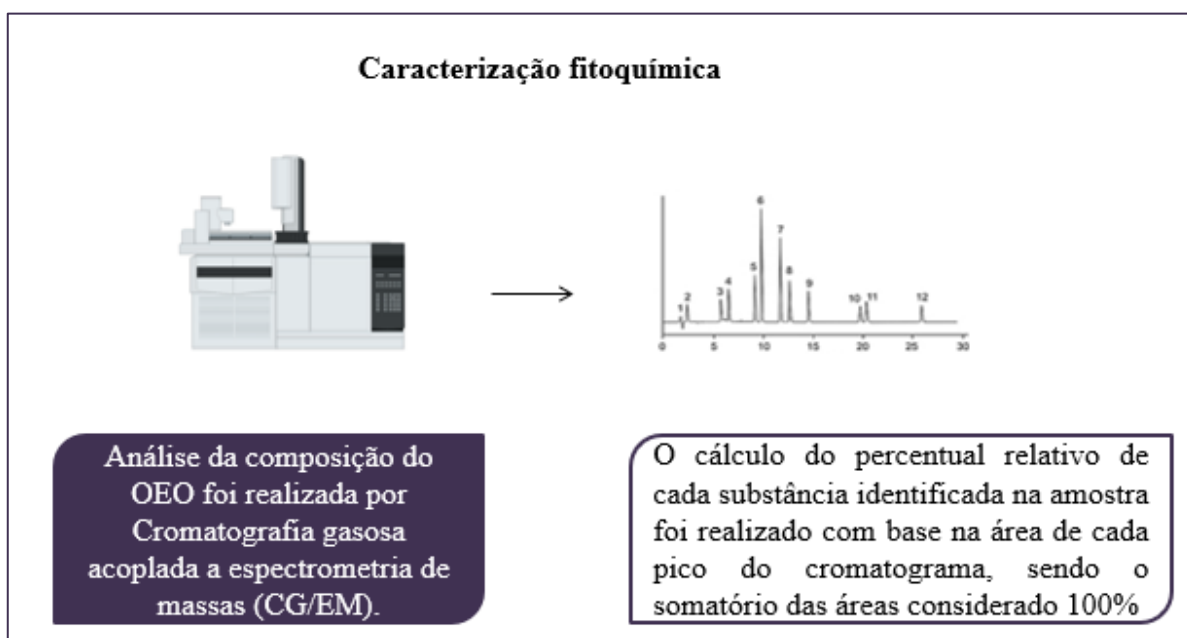
#### 4.4 Matéria prima vegetal

O óleo essencial de *Origanum vulgare L.* utilizado no desenvolvimento farmacotécnico do bioproduto foi adquirido comercialmente de uma empresa autorizada, com validade até junho de 2023 e lote 005.

#### 4.5 Caracterização fitoquímica

A análise da composição química do OEO adquiridos comercialmente, foi realizada utilizando-se Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), em equipamento QP2010 Plus (Shimadzu®). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e a temperatura usada foi de 60-250°C a uma taxa de aumento de 4°C/ minuto. Utilizou-se detector de massas com injetor Split (SPL) com um volume de injeção de 1 µL. O gás de arraste utilizado foi o gás Hélio. Os constituintes foram identificados através da biblioteca armazenada no banco de dados do *software* do equipamento. O cálculo do percentual relativo de cada substância identificada na amostra foi realizado com base na área de cada pico do cromatograma, sendo o somatório das áreas considerado 100%, representado na figura 6 (CHUTIA et al., 2009; TAO; JIA; ZHOU, 2014).

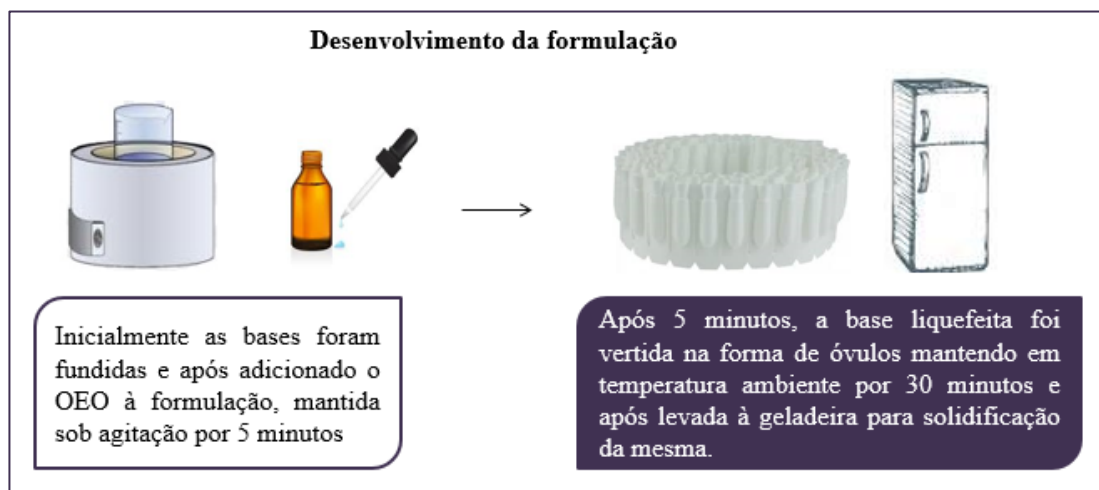
**Figura 6.** Fluxograma representando a metodologia utilizada.



#### 4.6 Desenvolvimento da formulação

Foi desenvolvida uma formulação de forma minimalista, com componentes de origem natural, cujos ingredientes são totalmente aceitáveis e seguros para uso vaginal. A formulação base do óvulo é do tipo lipofílica e foram desenvolvidas preparações separadamente da seguinte forma: manteiga de karité aquecida em Banho-Maria a  $\pm 35^{\circ}\text{C}$  e após sua completa fusão, verteu-se na embalagem descartável de PVC, em formato esférico, na coloração branca, mantendo em temperatura ambiente em média 30 minutos e após a solidificação da base, armazenado sob refrigeração, conforme mostra a figura 7. O mesmo método foi utilizado para a base de manteiga de cacau, Novata® e para a combinação entre as matérias primas manteiga de cacau e manteiga de karité. O princípio ativo foi acrescido na base após a definição da mesma, no momento da completa fusão da base, mantido sob agitação durante 5 minutos, dando continuidade ao método descrito acima. A concentração do óleo essencial utilizado foi 0,5 %.

**Figura 7.** Fluxograma do desenvolvimento da formulação.



#### 4.7 Avaliação organoléptica e físico-química das formulações

As formulações desenvolvidas e aprovadas após 24 horas do preparo foram avaliadas qualitativamente quanto o seu aspecto físico (coloração, homogeneidade por meio de análise visual e tátil, quebra ao manuseio e a presença de fissuras visuais), assim identificando possíveis processos de instabilidade físico e químicos. O pH foi determinado com o auxílio de um pHmetro modelo MP220, previamente

calibrado e utilizando as fitas testes. O valor do pH foi determinado, após inserir o eletrodo diretamente na amostra diluída a 10% em água purificada, a análise foi realizada em triplicata.

Conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira, foi realizado o teste de determinação de peso médio, individualmente pesou-se 20 óvulos e calculou-se a média.

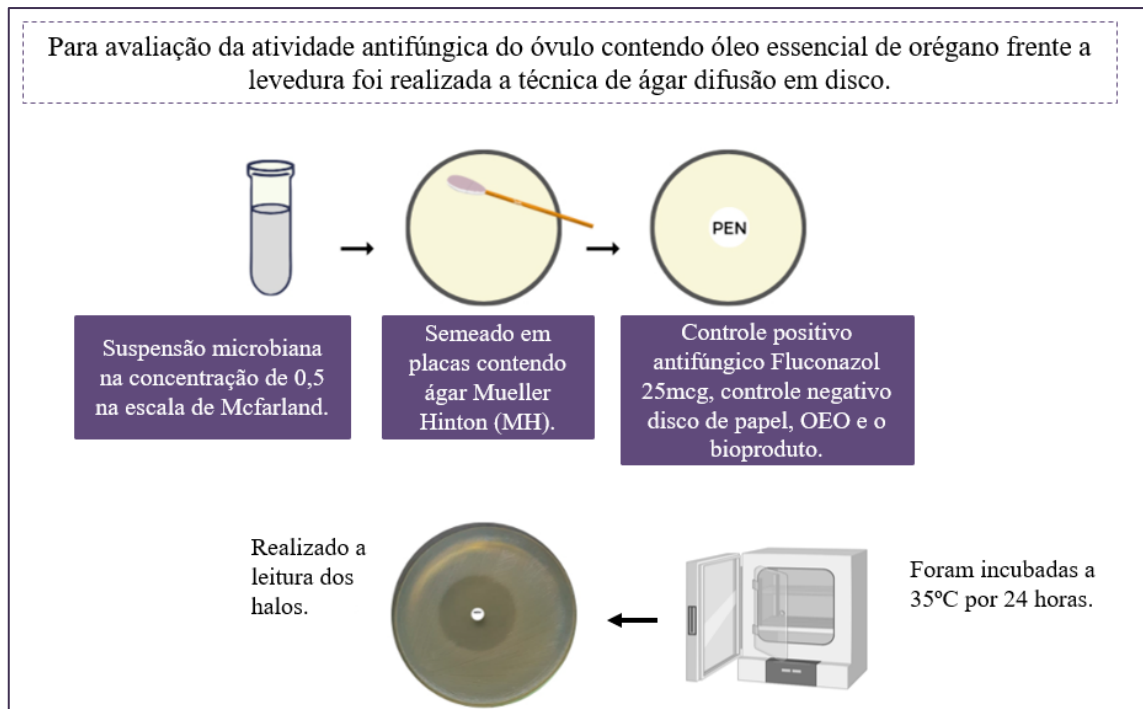
Foi realizado o teste de determinação do ponto de fusão, aqueceu-se 200mL de água em um Béquer a  $\pm 37^{\circ}\text{C}$ , com auxílio de um agitador magnético, adicionou-se uma unidade do óvulo, manteve-se um termômetro mergulhado no Béquer para o controle da temperatura (AULTON, 2005; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

#### **4.8 Análise Antifúngica do bioproduto**

Para avaliação da atividade antifúngica do óvulo contendo óleo essencial de orégano foi utilizado cepa de *Candida albicans*, doada pelo Hospital Ana Nery, uma amostra clínica isolada da levedura. Foi utilizada a técnica de ágar difusão em disco descrita por Abrantes e colaboradores (2013). Com uma alça de platina foi transferido do meio sólido de Sabourad Dextrose (SD), para o caldo Brain Heart Infusion (BHI) estéril, colônias da levedura, incubou-se por 24 horas, após, semeado pela técnica de esgotamento no ágar SD e incubou-se por mais 48hrs. Os inóculos foram preparados utilizando cloreto de sódio 0,9% (solução salina estéril) em uma suspensão microbiana na concentração de 0,5 na escala de Mcfarland, molhou-se um swab na suspensão e espalhou-se na placa contendo ágar Mueller Hinton (MH), sem deixar nenhum espaço da placa sem a suspensão, conforme representado na figura 8, esse procedimento foi repetido em triplicata para o controle negativo (discos estéreis de papel filtro), controle positivo (discos do antifúngico Fluconazol 25mcg), óleo essencial de Orégano e a solução do bioproduto. As placas ficaram incubadas em estufa a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24horas. Após a sua incubação, foi realizada a medição do diâmetro dos halos de inibição.



**Figura 8.** Fluxograma representando metodologia da análise antifúngica.



#### 4.9 Análise dos dados

Os resultados obtidos foram submetidos às análises estatísticas através da média e desvio padrão para comparar diferenças entre as medias obtidas, realizado no software *Excel 2019* (Microsoft Corporation, Redmond, Washignton, EUA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Análise da caracterização fitoquímica do óleo essencial

O OEO apresentou um líquido de coloração amarelo-escuro, com aroma característico forte e intenso. Como mostra a tabela 2, foram identificados ao total 17 compostos constituintes na amostra do OEO, os principais são terpenos, mono e sesquiterpenos, destes 4 apresentaram-se majoritariamente, Carvacrol, Timol, p-Cimeno e  $\gamma$ - Terpineno.

**Tabela 2.** Lista de compostos identificados na amostra do OEO.

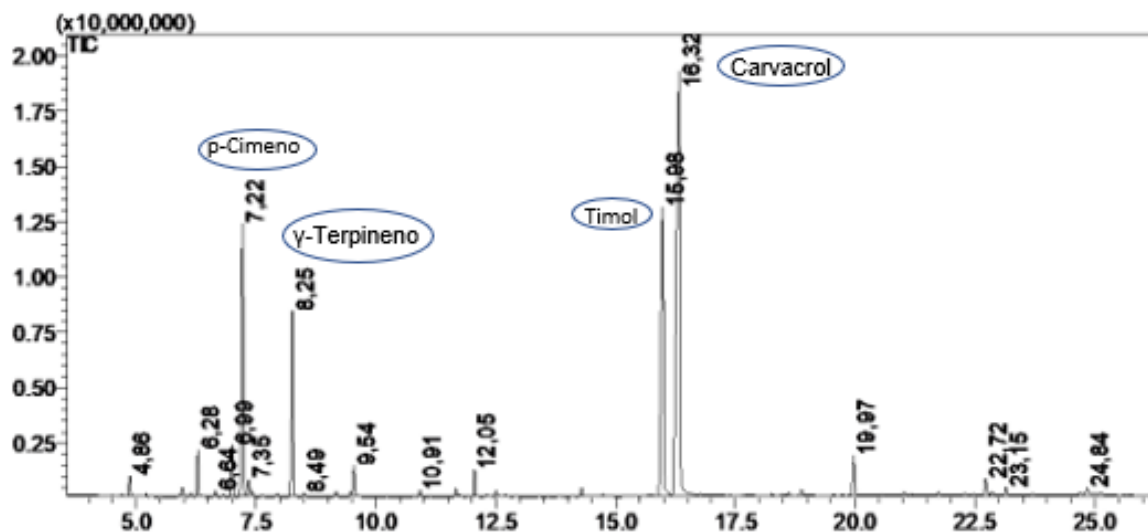
Nome	Área Relativa %	Similaridade %
alfa-Pineno	0,94	98
beta-Mirceno	1,98	96
alfa-Feladreno	0,26	96
alfa-Terpineno	2,22	96
<b>p-Cimeno</b>	<b>12,89</b>	<b>96</b>
Silvestreno	0,78	96
<b>gama-Terpineno</b>	<b>8,45</b>	<b>97</b>
4-Tujanol	0,23	96
Linalol	1,48	96
Cânfora	0,37	98
Terpinen-4-ol	1,43	98
<b>Timol</b>	<b>18,49</b>	<b>96</b>
<b>Carvacrol</b>	<b>43,29</b>	<b>97</b>
beta-Cariofileno	2,20	96
beta-Bisaboleno	1,10	95
delta-Cadineno	0,64	96
Óxido de Cariofileno	0,75	96
*Compostos não identificados	2,49	
Total	<b>100</b>	

**Fonte:** Laboratório de Central analítica da universidade de Santa Cruz do Sul, 2022.

Stupar e colaboradores (2014) também avaliaram a composição do óleo essencial de *Origanum vulgare* por CG-EM e encontraram carvacrol (64,06%) como constituinte majoritário, quantidades significativas de linalol (17,56%), p- cimeno (4,44) e uma baixa quantidade de timol (3,86%). Além disso, outros autores também avaliaram a composição do óleo orégano como, Gulsum e colaboradores (2017) por CG-EM e identificaram ao todo 21 compostos, apresentaram como principais constituintes o carvacrol (65,08%), seguindo de timol (10,49%),  $\gamma$ -Terpineno (7,34%) e p-cimeno (5.315%), muito semelhante a esse estudo, que também obtiveram como resultados esses 4 principais compostos como demonstra a figura 9.

De acordo com estudos feitos por Fikry e colaboradores (2019), a estação do ano que é feita a colheita e região que é plantada, tipo de solo e a técnica de extração causam variação na composição, mesmo dentro de uma mesma espécie. Outro estudo realizado por Mastro e colaboradores (2017), no sul da Itália com uma diversidade de OEO, de população diferente, também mostrou a variação entre os constituintes.

**Figura 9.** Cromatografia da amostra do óleo essencial



Fonte: Laboratório de Central analítica da universidade de Santa Cruz do Sul, 2022.

De acordo com outros estudos que também analisaram a composição de óleos essenciais, e obtiveram maior concentração de carvacrol na composição, compararam o efeito antimicrobiano do óleo e do componente isoladamente (puro) em concentrações iguais, o óleo essencial demonstrou melhor resposta, isso pode ser

explicado pela combinação do carvacrol com os demais constituintes dos óleos essenciais (TURGI; HAN; CAILLET; LACROIX,2009; POZZATTI et al., 2010).

## 5.2 Análise do desenvolvimento da formulação

As bases testadas como manteiga de cacau, manteiga de karité e a associação das mesmas, apresentaram aspecto físico quebradiço, pegajoso, dificuldade no momento da retirada da embalagem e ao manusear já liquefazia, demonstrando baixa estabilidade. A base Novata®, apresentou-se vantagem sobre as outras matérias-primas, tanto no aspecto físico e por não precisar incorporar conservante na formulação, devido a sua estrutura química, apresentada na figura 10. Após testar diferentes matérias primas do tipo lipofílicas para ser usada como base para o óvulo, optou-se por utilizar a base Novata®.

**Figura 10.** Imagens das bases obtidas.



Legenda: 1- Manteiga de cacau; 2- Manteiga de Karité; 3- Associação de Manteiga de cacau e karité; 4- Novata®.

Asikoglu e colaboradores (1995) realizaram um estudo utilizando nitrato de isoconazol e diferentes bases para supositório vaginal, dentre elas as hidrofílicas polietilenoglicol (PEG) PEG 6000, PEG 4000, PEG 1500 e as lipofílicas Novata® e Witepsol®, a taxa de liberação de fármaco por difusão microbiológica em disco foi maior nos derivados de PEG, seguindo por Witepsol® e por último a Novata®.

Conforme Noura e colaboradores (2021) desenvolveram supositórios vaginais com base de polietilenoglicol, usando com princípio ativo óleo essencial de semente de cominho, que na sua composição fitoquímica tem como principais constituintes os

monoterpenos, semelhantes aos do OEO utilizado no presente estudo e obtiveram excelentes resultados contra a candidíase vaginal.

### **5.3 Análise organoléptica e físico-química do bioproduto**

#### Aspecto Físico

A formulação elaborada com a base Novata® apresentou uma excelente aparência, textura lisa, coloração branca, totalmente homogeneizada, sem presença de fissuras e bom aspecto ao tato, representando um resultado satisfatório.

#### Peso médio

O peso médio dos óvulos foi de 3,3g, com variação entre 3,14g e 3,41g. Os óvulos apresentaram resultado satisfatório, pois estão dentro dos limites superior e inferior calculados, no caso 3,135g e 3,46g, e nenhuma amostra com variação superior a 5%, padrão especificado pela Farmacopeia Brasileira. Dessa forma, as formulações apresentam uniformidade de peso e resultado satisfatório.

#### pH

Apesar da Farmacopeia Brasileira não estabelecer a leitura de pH em produto acabado sólido, na análise realizada e pHmetro e pelas fitas testes em triplicata utilizou-se a quantidade equivalente a 1 óvulo. Após análise da formulação, a média do pH verificado em pHmetro foi de 5,89 e pelas fitas testes foi de 6,0, valor superior ao desejado. Considerando que o pH da vagina é de 4,5, o ideal seria um pH aproximado (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

#### Determinação da faixa de fusão

Após 5 minutos em temperatura a  $\pm 37^{\circ}\text{C}$ , o óvulo se fundiu totalmente, estando de acordo com o que determina a Farmacopeia, que após 30 minutos os óvulos com bases graxas e base de triglicerídeos devem se fundir totalmente a  $37^{\circ}\text{C}$  (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

#### 5.4 Análise da ação antifúngica

Os resultados referentes a atividade antifúngica do óleo essencial de orégano, do bioproduto, do controle negativo (disco estéril com solução salina) e do antifúngico utilizado como controle frente ao micro-organismo *Candida albicans* encontram-se na tabela 3. O óleo essencial apresentou um halo de inibição com média 51,35 mm, com uma diferença no desvio padrão, porém, podendo ser justificado pela diferença de densidade entre o meio ágar e óleo essencial, que ao ser adicionado ao disco pode ocorrer extravasamento, podendo então resultar em alterações de uma placa para outra.

Pozzatti e colaboradores (2010) analisaram a atividade dos óleos essenciais de orégano, tomilho, canela, gengibre, manjerição, sálvia e alecrim, para inibição do tubo germinativo de *Candida albicans*, todos foram capazes de inibir, o OEO foi o que obteve maior atividade. Em outro estudo Bona e colaboradores (2016) também analisaram a eficácia de 12 óleos essenciais pelo método disco-difusão, o OEO foi 100% eficaz contra cepas de *Candida albicans*.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial está relacionada com a lipofilicidade, o que resulta em perdas da composição enzimática e estruturais das células fúngicas (BARD et al., 1988; KURT; DOUGLAS, 1997). Em vários estudos foi constatado a atividade antifúngica do *Origanum vulgare* para uma diversidade de fungos, estando diretamente correlacionado com o alto teor de carvacrol encontrado no óleo essencial de orégano (KALEMBA; KUNICKA, 2003; RAKOTONIRAINY; LAVÉDRINE, 2005; KOCIC-TANACKOV et al., 2012).

**Tabela 3.** Atividade antifúngica do bioproduto, fluconazol e óleo essencial de orégano.

Amostra	Diâmetro de inibição (mm)*
	<i>Candida albicans</i>
<b>Bioproduto</b>	15,42± 1,70
<b>Disco estéril de papel filtro (Controle negativo)</b>	0
<b>Fluconazol (Controle positivo)</b>	29,65 ± 0,90
<b>Óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i></b>	51,37 ± 2,37

\*Valores apresentados com média ± desvio padrão

O desenvolvimento de biofilme por *Candida* pode estar correlacionado com a resistência aos antifúngicos. Portanto, por esses motivos apresentados favorece a exploração do uso de plantas medicinais no desenvolvimento de antimicrobianos, pois

não propiciam a resistência. Os óleos essenciais podem ser um aliado no tratamento da candidíase, sendo eficazes e um poderoso antifúngico, conforme demonstra vários estudos (BASSYOUNI et al., 2015; BUTASSI, E. et al., 2021; PAI et al., 2011).

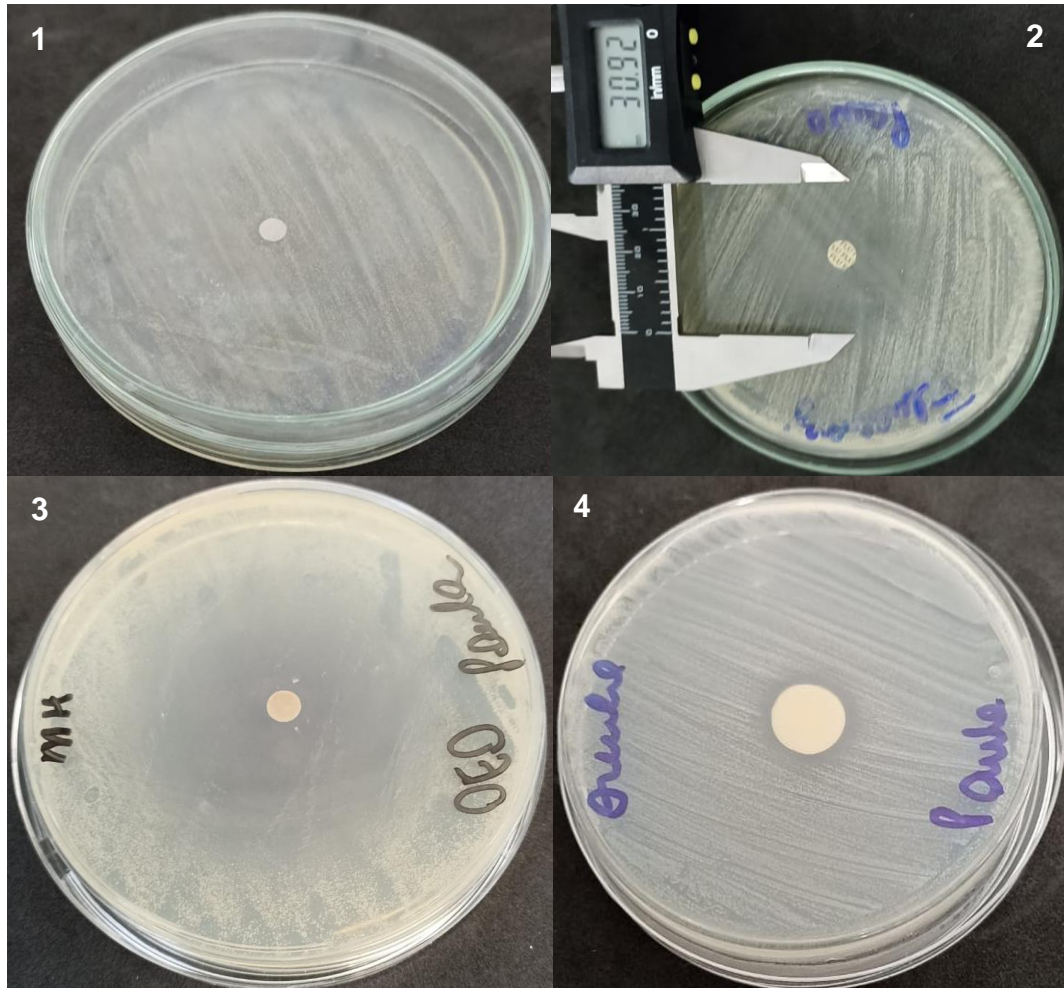
Em um estudo feito por Bassyouni e colaboradores (2019) envolvendo *Candida albicans* resistente ao fluconazol, demonstrou que o óleo essencial de erva-doce isolado e em combinação ao fluconazol trouxeram excelentes resultados contra essas cepas. Outro estudo também envolvendo o uso de óleo essencial, timol e fluconazol, concluíram que a associação dessas drogas desempenhou um papel antibiofilme frente a cepas de *Candida* resistente aos antifúngicos convencionais (JAFRI; AHMAD, 2020).

No resultado do presente trabalho representado na figura 11, que mostra o halo de inibição, foi que o fluconazol obteve sensibilidade frente a *Candida albicans*. Que conforme a tabela fornecida pelo fabricante, halos com diâmetro >19mm sensível, 19-14mm intermediário e <14 resistente.

Silva e colaboradores (2016) avaliaram pelo método de disco-difusão a sensibilidade de *Candida albicans* utilizando alguns agentes antifúngicos, dentre eles fluconazol 25mcg (CECON), a média dos halos foram de 29,38mm em meio suplementado e 29,24 mm, sem suplementação. O resultado foi que todas as cepas de *Candida* foram sensíveis ao antifúngico.

O bioproduto contendo OEO obtiveram halos de inibição com média 15,42 mm, apresentou um sutil desvio padrão, o que pode ser ocasionado pelo bioproduto ser sólido, sendo necessário solubilizar e aplicar diretamente no ágar, porque ao ser adicionada no disco a formulação solidifica e não consegue penetrar no ágar, porém, a mudança de temperatura ambiente e o tempo entre solubilizar e aplicar na placa pode interferir no resultado final. Não foi encontrado na literatura para comparação uma formulação igual ou com algum óleo essencial utilizando a base Novata®.

**Figura 11.** Resultado da atividade antifúngica frente a *Candida albicans*.



Legenda: 1- Controle negativo; 2- Controle positivo (fluconazol); 3- OEO;  
4- bioproduto



## 6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados na realização deste trabalho, foi possível concluir que:

- Foi possível desenvolver óvulos vaginais contendo matérias-primas naturais, obtidas de fontes vegetais e contendo OEO com potencial antifúngico;
- Os óvulos obtidos mostraram-se resistentes e estáveis ao manuseio, sem fissuras e rachaduras. Apresentaram coloração de acordo com o bioativo incorporado, com pH um pouco acima do esperado, não compatível com o pH da mucosa vaginal, o que deve ser aprofundado em estudos futuros.
- Foi possível realizar a análise fitoquímica da composição do OEO, que apresentou como constituintes majoritários o carvacrol (43%), timol (18%), cimeno (12%) e terpineno (8%);
- Quanto à atividade antifúngica, o resultado foi satisfatório, pois, obteve-se sensibilidade contra o micro-organismo *Candida albicans*.

## 7 PERSPECTIVAS

Apesar dos resultados apresentarem-se satisfatórios, é necessária a continuidade desse estudo, realizando outros testes e, se necessário, a troca da base e diminuição da porcentagem de bioativo incorporado. Além disso, outros estudos precisam ser feitos, a destacar:

- Realizar a concentração inibitória mínima do óleo essencial de *Origanum vulgare*;
- Realizar o teste de citotoxicidade do bioproduto;
- Realizar teste microbiológico de um produto comercial e comparar o resultado com o do bioproduto;
- Pesquisar uma matéria prima para incorporar ao óvulo que diminua o cheiro intenso e característico do OEO, mas sem interferir no principal objetivo;
- Testar frente a outras espécies de *Candida*.

## REFERÊNCIAS

- ABRANTES, Maiza Rocha de et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida albicans*. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 94, n. 3, p. 227 – 233, 2013.
- ACOG Committee on Practice Bulletins-Gynecology. ACOG Practice Bulletin. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists, n.72, Maio 2006: *vaginitis*. *Obstet. Gynecol.*, v. 107, n. 5, p. 1195-1206, 2006.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. 2. ed. Brasília: ANVISA, 2012.
- ASIKOGLU M, ERTAN G, COSAR G. The release of isoconazole nitrate from different suppository bases: in-vitro dissolution, physicochemical and microbiological studies. *J Pharm Pharmacol*; v.47, p.713-716, 1995.
- AULTON, Michael E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 540-543, 2005.
- AULTON, M.E.; TAYLOR, K.M.G. Delineamento de formas farmacêuticas, 4ed., Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1433-1456, 2016.
- ASSIRI, A. M. A. et al. Cold-pressed oregano (*Origanum vulgare*) oil: a rich source of bioactive lipids with novel antioxidant and antimicrobial properties. *European Food Research and Technology*, v. 242, p. 1013–1023, 2016.
- AVOLA R. et al. Oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil provides anti-inflammatory activity and facilitates wound healing in a human keratinocytes cell model. *Food and Chemical Toxicology*, v. 144, 2020.
- BARD, M. et al. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids*, v. 23, 6.ed., p. 534-538, 1988.
- BASSYOUNI, R. H. et al. Conjunctival microbiota and antibiotic resistance pattern in patients submitted to cataract surgery and antibacterial activity of some plant essential oils. *The Egyptian Journal of Medical Microbiology*, v. 38, n. 3293, p. 1-9, 2015.
- BASSYOUNI, R. H. et al. Fennel oil: A promising antifungal agent against biofilm forming fluconazole resistant *Candida albicans* causing vulvovaginal candidiasis. *Journal of Herbal Medicine*, v. 15, p. 100227, 2019.
- BEGNINI, K. R. et al. Composition and antiproliferative effect of essential oil of *Origanum vulgare* against tumor cell lines. *Journal of Medicinal Food*, v. 17, n. 10, p. 1129–1133, 2014.

BONA, E. et al. Candida albicans sensitivity to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? *Journal of applied microbiology*, v.121, 6 ed., p. 1530-1545, 2016.

BOUYAHYA, A. et al. Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacology of *Origanum majorana* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 265, 2021.

BROCHOT, A. et al. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. *MicrobiologyOpen*, v. 6, n. 4, 2017.

BUTASSI, E. et al. Fungal Biofilms as a Valuable Target for the Discovery of Natural Products That Cope with the Resistance of Medically Important Fungi-Latest Findings. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* vol. 10,9 1053, 2021.

CAMARGO MFP de. Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica. 119p. São Paulo, 2008. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas] - Universidade de São Paulo).

CARVALHO, Newton Sergio de et al. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecções que causam corrimento vaginal. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 30, n. spe1, 2021.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION; WORKOWSKI, K.A.; BERMAN, S. M. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. *MMWR Recomm. Rep.* v. 55, n. RR-11, p. 1-94, 2006.

CHUTIA, M. et al. Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT-Food Science and Technology*, v. 42, n. 3, p. 777-780, 2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010.

FELIX T.C.; RÖDER D. V. D. B.; PEDROSO, R. S. Alternative and complementary therapies for vulvovaginal candidiasis. *Folia microbiologica*, v. 64, n. 2, p. 133-141, 2019.

FERREIRA, A.; BRANDÃO, M.F. Guia prático da farmácia magistral. 4. ed. São Paulo: Pharmabooks, p. 430-433, 2010-2011.

FERRIANI, R. A.; VIEIRA, C. S.; BRITO, L. G. O. Rotinas em ginecologia. Editora Atheneu, SP, p. 223-224, 2015.

FIKRY, S.; KHALIL, N. & SALAMA, O. Perfil químico, biostática e dinâmica biocida do óleo essencial de *Origanum vulgare* L., *AMB*, p. 41, 2019.

FREITAS, F. et al. Rotinas em ginecologia 6.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, p.196-197, 2011.

GONÇALVES, Bruna et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 42, n. 6, p. 905–927, 2016.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 1647 p.

GULSAH, Y., YELIZ, A.K., GULSAH, Y. Phytochemical Analysis, Antioxidant and Antibacterial Activities of Four Lamiaceae Species Cultivated in Barnyard Manure. *Journal of agricultural sciences*; v.23, p. 95-108, 2017.

HOFFMAN, B. L. et al. Ginecologia de Williams. Porto Alegre; AMGH, 2ªed, p. 83, 2014.

HRNČIČ, M. K. et al. Extraction Techniques and Analytical Methods for Characterization of Active Compounds in *Origanum* Species. *Molecules*, v. 25, n. 10, p. 4735, 2020.

JAFRI, H.; AHMAD, I. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal de Mycologie Médicale*, v.30, 1ª ed., p. 100911, 2020.

KALEMBA, D. A. A. K.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KATZUNG, Bertram G.; MASTERS, Susan B.; TREVOR, Anthony J. Farmacologia Básica & Clínica 12ª Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2014.

KARAMAN, M. et al. Origanum vulgare essential oil affects pathogens causing vaginal infections. *Journal of Applied Microbiology*, v.122, n. 5, p.1177-1185, 2017.

KOCIC-TANACKOV, S. D. et al. Atividade antifúngica do extrato de orégano (*origanum vulgare* L.) no crescimento de espécies de *Fusarium* e *Penicillium* isoladas de alimentos/Antifúngicos aktivnost ekstrakta origana (*origanum vulgare* L.) na rast *Fusarium* i *Penicillium* vrsta izolovanih iz hrane. *Hemijska Industrija*, v. 66, n. 1, p. 33-42, 2012.

KOSAKOWSKA, O. et al. Antioxidant and Antibacterial Activity of Essential Oils and Hydroethanolic Extracts of Greek Oregano (*O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) letswart) and Common Oregano (*O. vulgare* L. subsp. *vulgare*). *Molecules*, v. 26, n. 4, p. 988, 2021.

KURTZ, M.B.; DOUGLAS, C.M. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *Journal Med Vet Mycol.*, v. 35, p. 79-86; 1997.

LEYVA-LÓPEZ, N. et al. Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, vol. 22, n.6, p. 1-24, 2017.

LOMBREA, À. et al. A Recent Insight Regarding the Phytochemistry and Bioactivity of *Origanum vulgare* L. Essential Oil. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n.24, p. 1-27, 2020.

LOPES, Reginaldo G. C. *Conduas em ginecologia*. Editora Atheneu, 1ªed, SP, p. 88-89, 2015.

MANDRAS, N. et al. The Inhibition of Non- *albicans Candida* Species and Uncommon Leveast Pathogens by Selected Essential Oil and Your Major Compounds. *Molecules*, v. 26, n.16, p. 1-10, 2021.

MASTRO G, TARRAF W, VERDINI L, BRUNETTI G, RUTA C. Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. *Elsivier*; v. 235, p. 1-6, 2017.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para atenção integral às pessoas com infecções sexualmente transmissíveis (IST) [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; p.117-119, 2020.

MORSHEDLOO et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils in *Origanum vulgare* subsp. *gracile* at different phenological stages and plant parts. *Journal of Food Processing and Preservation*, v.42, n.2, p.1-18, 2017.

NAZZARO, F. et al. Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, v. 10, n. 4, p. 1-20, 2017.

NOURA H, A. E. et al. Vaginal suppositories of cumin seeds essential oil for treatment of vaginal candidiasis: Formulation, in vitro, in vivo, and clinical evaluation, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 157, 2021.

ONIGA I. et al. *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: Chemical Composition and Biological Studies. *Molecules*, v. 23, n. 8, p. 2077, 2018.

PAI, M. BH. et al. Antifungal efficacy of *Punica granatum*, *Acacia nilotica*, *Cuminum cyminum* and *Foeniculum vulgare* on *Candida albicans*: an in vitro study. *Indian Journal of Dental Research*, v. 21, n. 3, p. 334, 2010.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, n. 5, p. 503-535, 2009.

PEZZANI, R., VITALINI, S. & IRITI, M. Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: uma atualização. *Phytochemistry Reviews* 16, 1253–1268 (2017).

POZZATTI, P. et al. Activities of essential oils in the inhibition of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* germ tube formation. *Journal de Mycologie Médicale*, v.20, 3 ed., p. 185-189, 2010.

RAKOTONIRAINY, M. S.; LAVÉDRINE, B. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives

storage areas. *International biodeterioration & biodegradation*, v. 55, n. 2, p. 141-147, 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

REHAB, S. et al. Antifungal resistance of *Candida* species isolated from Iraqi women infected with vulvovaginal Candidiasis. *Al-Qadisiyah Medical Journal*, v. 7, n. 11, p. 117-127, 2011.

SANCHES, J. M. et al. Aspectos Laboratoriais da Vaginose Citolítica e Candidíase Vulvovaginal como Chave para o Diagnóstico Preciso: Um Estudo Piloto. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 42, n. 10, 2020.

SHARIFI-RAD, M. et al. Phytochemical constituents, biological activities, and health-promoting effects of the genus *Origanum*. *Phytotherapy Research*, v. 35, n.1, p. 95-121, 2021.

SILVA, A.C.N. et al. Teste de sensibilidade de *Candida albicans* pelo método de disco-difusão: uma comparação de meios de cultura. *Revista Brasileira de análises clínicas*, v.48, 4.ed., p.362-369, 2016.

SOBEL, J. D. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 152, p. 924, 1985.

SOLTANI, S. et al. A Review of the Phytochemistry and Antimicrobial Properties of *Origanum vulgare* L. and Subspecies. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 20, n.2, p. 268-285, 2021. 2021.

STUPAR, M. et al. Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. *South African Journal of Botany*, v. 93, p. 118-124, 2014.

TAO, N; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, v. 153, n. 1, p. 265-271, 2014.

TURGI, M.; HAN, J.; CAILLET, S., LACROIX, M. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*, v. 20, p. 1073-1079, 2009.

YANO, J. et al. Perspectivas atuais do paciente de candidíase vulvovaginal: incidência, sintomas, manejo e resultados pós-tratamento. *BMC Womens Health*. 2019;

YASSIN, MT, MOSTAFA, AA, AL-ASKAR, AA et al. Perfil de resistência antifúngica in vitro de cepas de *Candida* isoladas de mulheres saudáveis que sofrem de vulvovaginite. *Eur J Med Res* 25, 1, 2020.

## ANEXO A – RELATÓRIO DE ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA DO OEO

### Relatório de Análise Solicitante:

Chana Medeiros

### Análise:

Perfil cromatográfico de óleo essencial

### Amostra:

Óleo essencial de Orégano – *Origanum vulgare*

ID amostra/arquivo: "OE Orégano prof Chana"

Lote: -

Tipo de Extração: -

Data da validade: -

### Técnica de análise:

Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas Equipamento da marca *Shimadzu*, Modelo GCMS-QP2010 plus.

### Método:

Parâmetros de análise cromatográfica: Temperatura do injetor 250°C, Modo de injeção *Split*, Fluxo 1 mL min<sup>-1</sup>, Gás de arraste: Hélio, Coluna capilar: DB-5MS (30mx0.25mmx0.25µm), Gradiente de temperatura do forno: temperatura inicial 60°C - 2min. taxa 4°C/min até 200°C e taxa 6°C/min até 260°C - 10min., Temperatura do detector de massas: 260°C, Temperatura da Fonte de ionização: 280°C e Modo de aquisição: *scan*

### Considerações:



As identificações dos compostos são obtidas através da comparação dos espectros de massas das amostras com os da biblioteca NIST17.L, sendo apresentado na tabela de resultados o grau de similaridade de cada identificação. O cálculo do percentual relativo de cada substância identificada na amostra é realizado com base na área de cada pico do cromatograma, sendo o somatório das áreas considerado 100%. Para o cálculo de percentual considerase os picos dos compostos eluidos da coluna e identificados por similaridade e os picos eluidos da coluna não identificados devido à baixa similaridade, todos oriundos da amostra.

### Resultados:

Na tabela 1 apresenta-se a lista de compostos identificados, suas concentrações relativas, grau de similaridade com a biblioteca de compostos referência, o tempo de retenção na coluna e o código de registro no CAS.

Na figura 1 apresenta-se o cromatograma da amostra analisada.

Tabela 1. Lista de compostos identificados na amostra de óleo essencial.

Nome	Área Relativa, %	Similaridade, %	Tempo de Retenção, min	**CAS#
alfa-Pineno	0,94	98	4,86	80-56-8
beta-Mirceno	1,98	96	6,28	123-35-3
alfa-Feladreno	0,26	96	6,64	99-83-2
alfa-Terpineno	2,22	96	6,99	99-86-5
p-Cimeno	12,89	96	7,22	99-87-6
Silvestreno	0,78	96	7,35	1461-27-4
gama-Terpineno	8,45	97	8,25	99-85-4
4-Tujanol	0,23	96	8,49	546-79-2
Linalol	1,48	96	9,54	78-70-6
Cânfora	0,37	98	10,91	464-49-3
Terpinen-4-ol	1,43	98	12,05	562-74-3
Timol	18,49	96	15,98	89-83-8
Carvacrol	43,29	97	16,32	499-75-2
beta-Cariofileno	2,20	96	19,97	87-44-5
beta-Bisaboleno	1,10	95	22,72	495-61-4
delta-Cadineno	0,64	96	23,15	483-76-1
Óxido de Cariofileno	0,75	96	24,84	1139-30-6
*Compostos não identificados	2,49			
<b>Total</b>	<b>100</b>			

\* Compostos com baixa similaridade com os espectros da Biblioteca devido a baixa concentração e/ou coeluição da coluna.

\*\*O registro CAS de um composto químico, é um número com um registro único no banco de dados do *Chemical Abstracts Service* que atribui esses números a cada produto químico que é descrito na literatura.

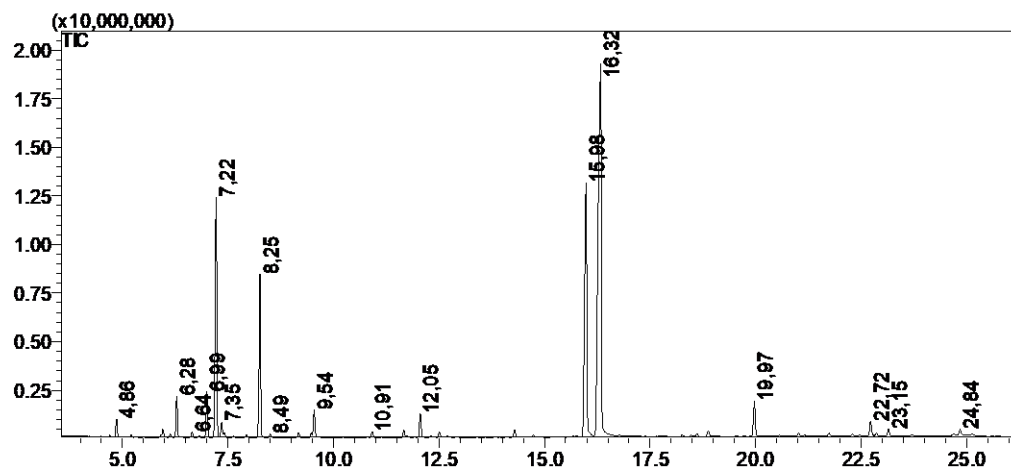


Figura 1: Cromatograma da amostra de óleo essencial.

Anotação de Função Técnica (AFT): 188379 CRQ V

Assinatura responsável técnico: Rosana Schneider

Rosana de Cassia de Souza Schneider

CRQ 5° Região - n° 05100730

Santa Cruz do Sul, 17 de Maio de 2022.