



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**

**IVEN NEYLLA FARIAS VALE MENDES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO E  
ANTIVIRULÊNCIA DO CINAMALDEÍDO CONTRA ISOLADOS  
CLÍNICOS DE ONICOMICOSE E OBTENÇÃO DE BIOPRODUTO  
COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA TÓPICA**

SÃO LUÍS - MA  
2021

**IVEN NEYLLA FARIAS VALE MENDES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO E  
ANTIVIRULÊNCIA DO CINAMALDEÍDO CONTRA ISOLADOS  
CLÍNICOS DE ONICOMICOSE E OBTENÇÃO DE BIOPRODUTO  
COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA TÓPICA**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

**Coorientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina de Andrade Monteiro

**Área de concentração:** Biotecnologia em Saúde.

SÃO LUÍS - MA  
2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos  
pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

MENDES, IVEN NEYLLA FARIAS VALE.

Avaliação do potencial antifúngico e antivirulência do cinamaldeído contra isolados clínicos de onicomicose e obtenção de bioproduto com atividade antifúngica tópica / IVEN NEYLLA FARIAS VALE MENDES. - 2021.

151 f.

Coorientador(a): Cristina de Andrade Monteiro.

Orientador(a): Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2021.

1. Antifúngico. 2. Candida. 3. Cinamaldeído. 4. Onicomicose. 5. Virulência. I. Monteiro, Cristina de Andrade. II. Nascimento, Maria do Desterro Soares Brandão. III. Título.

**IVEN NEYLLA FARIAS VALE MENDES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO E  
ANTIVIRULÊNCIA DO CINAMALDEÍDO CONTRA ISOLADOS  
CLÍNICOS DE ONICOMICOSE E OBTENÇÃO DE BIOPRODUTO  
COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA TÓPICA**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento (Orientadora)**  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina de Andrade Monteiro (Coorientadora)**  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Geusa Felipa de Barros Bezerra**  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof. Dr. Lídio Gonçalves Lima Neto**  
Universidade CEUMA

---

**Prof. Dr. Luis Conrado Zaror**  
Universidad Mayor, sede Temuco, Chile

---

**Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade**  
Universidade Federal do Maranhão

*À minha mãe, Maria Ester Farias Vale  
(in memoriam).*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à DEUS pela sua infinita misericórdia e por ter permitido que eu chegasse até aqui. Por ter colocado no meu caminho pessoas que foram fundamentais nessa conquista.

À minha mãe Maria Ester Farias Vale a quem eu dedico esse trabalho. Por ter me incentivado e por me fazer acreditar que eu poderia chegar onde quisesse.

Ao meu pai Nedival Natividade Machado Vale que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo André de Sousa Mendes por todo apoio e por estar ao meu lado me dando forças e por ter sempre a palavra certa no momento certo. Por fazer das minhas conquistas suas também.

À minha tia Maria Eva Farias que me “adotou” depois que minha mãe partiu e me ajudou a cuidar do meu pai e da casa permitindo que eu tivesse tempo para me dedicar ao doutorado.

À minha orientadora Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento pela disponibilidade em me orientar nesse trabalho e pela paciência na condução do trabalho.

À minha coorientadora na presente tese e orientadora da vida Cristina de Andrade Monteiro. Minha mentora e meu modelo de profissional competente e dedicada. Agradeço não só pela parceria nesse trabalho, cujo tema foi sugerido por ela, mas por todos os anos de aprendizado.

Aos companheiros de laboratório pela parceria nos testes: Olinda, Carmem, Camylla, Douglas, Michele, Rayssa, Micaella, Vannyana, Brenda, Mirella e Josivan Régis.

Aos bolsistas de iniciação científica do IFMA Campus Monte Castelo que fizeram parte desse trabalho Larissa dos Santos e Isaac de Goes.

Ao colega de doutorado Anderson França por ter me incentivado a participar da seleção e por todo apoio dado ao longo da pesquisa.

Ao sr. Hélio e ao sr. Marinaldo e a todos os técnicos de laboratório da Universidade CEUMA por estarem sempre prontos a nos ajudar qualquer que fosse a nossa necessidade.

Ao professor Silvio Monteiro pelas dicas nas análises estatísticas.

Ao professor Saulo Lima, responsável pelo setor de patentes da Universidade CEUMA pelo auxílio da escrita da patente.

À professora Julliana Ribeiro e ao professor Rodrigo Holanda, pelas dicas importantes sobre os estudos com fungos filamentosos. Sempre disponíveis e solícitos.

À professora Elizabeth Soares Fernandes que deu a ideia de utilizar o cinamaldeído como objeto de estudo frente aos isolados fúngicos.

Ao professor Lídio Gonçalves pelas valiosas dicas ao longo do trabalho e pelas contribuições na qualificação.

Às professoras Maria do Socorro Cartégenes e Ana Lúcia Abreu Silva que também trouxeram importantes contribuições na qualificação.

À Dr<sup>a</sup> Luciana Barros, Jullianny Barroso e a Bellafarma pelo auxílio com as formulações à base de cinamaldeído.

Aos meus colegas de trabalho do Instituto Federal do Maranhão – Campus Itapecuru Mirim por todo apoio e compreensão, especialmente dos diretores, durante todo o doutorado.

Às secretárias da RENORBIO Camilla e Adriana, sempre disponíveis para resolver nossas questões acadêmicas.

Aos professores da RENORBIO pela contribuição na minha formação.

Aos pastores e líderes da Igreja Presbiteriana Renovada do Maiobão pelas orações e suporte espiritual.

À Universidade CEUMA pelo apoio desde a iniciação científica, no mestrado e pela disponibilização dos laboratórios onde a maior parte da presente pesquisa foi realizada.

À Universidade Federal do Maranhão, que agora faz parte da minha formação, por todo aprendizado.

Ao Instituto Federal do Maranhão que me tornou bióloga e que hoje tenho a oportunidade de retribuir oferecendo aos meus alunos o ensino de qualidade que um dia me foi proporcionado.

Aos meus alunos, a razão de todo esse processo. Eles são minha maior motivação. É por eles que eu busco qualificação para oferecer o melhor do meu trabalho.

*"As investigações científicas revelam novas maneiras com as quais Deus trabalha e nos trazem revelações mais profundas do totalmente desconhecido".*

*Maria Mitchell*



## RESUMO

**Introdução:** As onicomicoses representam grandes desafios terapêuticos tanto pelo reduzido quantitativo de fármacos disponíveis quanto pela resistência às substâncias disponíveis na clínica. Com isso se faz necessário a busca por terapias alternativas e uma importante fonte são os óleos essenciais entre eles o óleo essencial da canela que tem como principal composto o cinamaldeído (CNMA) que apresenta várias atividades biológicas já conhecidas. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro*, incluindo-se um modelo de infecção em unhas, e *in vivo* do CNMA, bem como as propriedades anti-virulência com o propósito de obtenção de uma formulação tópica à base do composto. **Material e Métodos:** A atividade antimicrobiana do CNMA foi avaliada *in vitro* contra isolados clínicos de *Candida* e fungos filamentosos obtidos a partir de lesões cutâneas de pacientes com AIDS, por meio da obtenção da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e da Concentração Fungicida Mínima (MFC). Também foi avaliado o efeito antimicrobiano combinatório entre CNMA e os antifúngicos itraconazol (ITL) e terbinafina (TRB) por meio do teste de tabuleiro de xadrez. Os efeitos anti-aderência e anti-biofilme do CNMA foram determinados pela contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/ml e o teste de toxicidade foi realizado em larvas de *Tenebrio molitor*. Unhas foram coletadas de voluntários saudáveis e usadas em um modelo de infecção por fungos filamentosos ( $10^4$  conídios/mL). As unhas infectadas foram então tratadas com CNMA ou TRB e incubadas por 30 dias a 27°C. Após a incubação as unhas foram avaliadas em estereomicroscópio com aumento de 75x. O efeito do CNMA sobre a infecção de larvas de *T. molitor* com *Candida* ( $10^6$  células/mL) foi verificado após o tratamento destas com diferentes concentrações do composto (MIC, MICx2 ou MICx4) e comparado às larvas controles infectadas e tratadas com antifúngicos (Fluconazol e ITL). Os dados foram analisados estatisticamente pelo GraphPad Prism 5 (2007). A avaliação do potencial fúngico CNMA (microdiluição) foi feita pelo teste de independência do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou pelo teste exato de Fisher. Os testes de biofilme foram avaliados pelo teste ANOVA. O método de Kaplan-Meier foi usado para calcular os percentuais de sobrevivência e o teste Log-Rank para comparar as curvas de sobrevivência. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. **Resultados:** O CNMA apresentou efeito antifúngico com MICs entre 19,5 e 156  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , reduziu a aderência e interferiu na formação de biofilme por *Candida* ( $p < 0,0001$ ). CNMA também interagiu sinergicamente com terbinafina e itraconazol reduzindo significativamente o crescimento dos fungos (FIC = 0,1645 para *C. parapsilosis* e  $0,26 \geq \text{FIC} \geq 0,01$  para *Trichophyton interdigitale*). No teste de toxicidade a menor taxa de sobrevivência foi de 84,2% na concentração de 156  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , sugerindo que nas concentrações testadas o CNMA apresenta baixa toxicidade. O composto reduziu o desenvolvimento de fungos em infecção já estabelecida em fragmentos de unhas de forma mais rápida em comparação aos antifúngicos convencionais testados. O cinamaldeído reduziu micélio fúngico em unhas infectadas com *T. interdigitale*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum*. Também foram observadas concentrações sinérgicas entre o cinamaldeído e itraconazol e terbinafina em *T. interdigitale*. Larvas infectadas com *Candida* e tratadas CNMA tiveram maior sobrevida do que as tratadas com itraconazol, o que corrobora o potencial terapêutico do composto. Uma formulação tópica para unhas à base de óleo vegetal contendo CNMA (concentrações de acordo com os resultados obtidos) foi desenvolvida para testes posteriores. **Conclusão:** CNMA apresentou propriedades antifúngica e anti-virulência contra leveduras e fungos filamentosos em concentrações abaixo de 156  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , e efeito sinérgico com os antifúngicos itraconazol e terbinafina tornando possível

sua utilização na terapêutica em associação com os fármacos tradicionais. As populações fúngicas de leveduras e fungos filamentosos infectando larvas de *T. molitor* e fragmentos de unha foram reduzidas após tratamento com CNMA. Desta forma, o CNMA demonstrou ser uma substância que não apresentou toxicidade nas concentrações terapêuticas testadas e se mostrou como uma alternativa para o tratamento de doenças fúngicas cutâneas. Além disso, o cinamaldeído apresenta-se como uma substância antimicrobiana com potencial terapêutico sozinho ou em combinação com outros compostos.

**Palavras-chave:** *Cinnamomum zeylanicum*, atividade antifúngica, cinamaldeído, potencial terapêutico

## ABSTRACT

**Introduction:** Onychomycosis represents great therapeutic challenges both due to the reduced quantity of available drugs and the resistance to the substances available in the clinic. With this, it is necessary to search for alternative therapies and an important source are essential oils, including cinnamon essential oil, whose main compound is cinnamaldehyde (CNMA), which has several known biological activities. The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial potential in vitro, including a nail infection model, and in vivo CNMA, as well as the anti-virulence properties in order to obtain a topical formulation based on the compound. **Material and Methods:** The antimicrobial activity of CNMA was evaluated in vitro against clinical isolates of *Candida* and filamentous fungi obtained from skin lesions of patients with AIDS, by obtaining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Fungicidal Concentration (MFC). The combinatory antimicrobial effect between CNMA and the itraconazole (ITL) and terbinafine (TRB) antifungals was also assessed using the chessboard test. The anti-adherence and anti-biofilm effects of CNMA were determined by counting the number of Colony Forming Units (CFU) / ml and the toxicity test was performed on larvae of *Tenebrio molitor*. Nails were collected from healthy volunteers and used in a filamentous fungal infection model ( $10^4$  conidia / mL). The infected nails were then treated with CNMA or TRB and incubated for 30 days at 27 ° C. After incubation, the nails were evaluated in a stereomicroscope with a 75 × magnification. The effect of CNMA on infection of *T. molitor* larvae with *Candida* ( $10^6$  cells / mL) was verified after treatment with different concentrations of the compound (MIC, MIC × 2 or MIC × 4) and compared to the infected and control larvae treated with antifungals (Fluconazole and ITL). Data were analyzed by the statistical program GraphPad Prism 5 (2007). The evaluation of CNMA fungal potential (microdilution) was made by the chi-square independence test ( $\chi^2$ ) or by Fisher's exact test. Biofilm tests were evaluated by ANOVA test. The Kaplan-Meier method was used to calculate the survival percentages and the Log-Rank test to compare survival curves. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. **Results:** CNMA showed an antifungal effect with MICs between 19.5 and 156  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , reduced adherence and interfered with *Candida* biofilm formation ( $p < 0.0001$ ). CNMA also interacted synergistically with terbinafine and itraconazole, significantly reducing the growth of fungi (FIC = 0.1645 for *C. parapsilosis* and  $0.26 \geq \text{FIC} \geq 0.01$  for *Trichophyton interdigitale*). In the toxicity test, the lowest survival rate was 84.2% at a concentration of 156  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , suggesting that in the tested concentrations, CNMA has low toxicity. The compound reduced the development of fungi in infection

already established in fragments of nails more quickly compared to conventional tested antifungals. Cinnamaldehyde reduced fungal mycelium in nails infected with *T. interdigitale*, *Trichophyton rubrum* and *Microsporum gypseum*. Synergistic concentrations between cinnamaldehyde and itraconazole and terbinafine were also observed in *T. interdigitale* Larvae infected with *Candida* and treated with CNMA had a longer survival than those treated with itraconazole, which corroborates the therapeutic potential of the compound. A topical formulation for nails based on vegetable oil containing CNMA (concentrations according to the results obtained) was developed for further testing. **Conclusion:** CNMA showed antifungal and anti-virulence properties against yeasts and filamentous fungi in concentrations below 156 µg / mL, and a synergistic effect with the antifungal agents itraconazole and terbinafine making it possible to be used in therapy in combination with traditional drugs. The fungal populations of yeasts and filamentous fungi infecting *T. molitor* larvae and nail fragments were reduced after treatment with CNMA. Thus, CNMA proved to be a substance that did not present toxicity in the tested therapeutic concentrations and proved to be an alternative for the treatment of cutaneous fungal diseases. In addition, cinnamaldehyde appears as an antimicrobial substance with therapeutic potential alone or in combination with other compounds.

**Keywords:** *Cinnamomum zeylanicum*, antifungal activity, cinnamaldehyde.