

ANÁLISE DO TIPO DE DANO CAUSADO POR *Croton urucurana* EM *Candida albicans*

ANALYSIS OF THE TYPE OF DAMAGE CAUSED BY Croton urucurana EM Candida albicans

ANÁLISIS DEL TIPO DE DAÑO CAUSADO POR *Croton urucurana* EM *Candida albicans*

PUBLICADO: 09/2023

<https://doi.org/10.47820/recima21.v4i1.4190>

Anápolis - Goiás

2021

André Lucas Seixas Macalão
Edson José Pereira Junior
João Manoel Palmeira Ferrato Gomes
Mikaela Aires Martins Ribeiro
Paola Souza Manzi
Thalita Lisboa Cunha

ANÁLISE DO TIPO DE DANO CAUSADO POR *Croton urucurana* EM *Candida albicans*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Iniciação Científica do curso de medicina da Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA, sob a orientação do Prof. Dr. Humberto de Sousa Fontoura e coorientação da Prof. Dra Livia do Carmo Silva.

Anápolis - Goiás

2021

**ENTREGA DA VERSÃO FINAL
DO TRABALHO DE CURSO
PARECER FAVORÁVEL DO ORIENTADOR**

À

Coordenação de Iniciação Científica

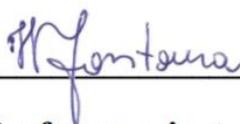
Faculdade da Medicina – UniEvangélica

Eu, Prof^(a) Orientador Humberto de Sousa Fontoura, venho, respeitosamente, informar a essa Coordenação, que os(as) acadêmicos(as): André Lucas Seixas Macalão, Edson José Pereira Junior, João Manoel Palmeira Ferrato Gomes, Mikaela Aires Martins Ribeiro, Paola Souza Manzi, Thalita Lisboa Cunha estão com a versão final do trabalho intitulado Análise do tipo de dano causado por *Croton urucurana* em *Candida albicans* pronta para ser entregue a esta coordenação.

Declara-se ciência quanto a publicação do referido trabalho, no Repositório Institucional da UniEVANGÉLICA.

Observações:

Anápolis, 15 de novembro de 2021



Professor orientador

RESUMO

Candida albicans é um fungo diploide, polimórfico, presente na microbiota normal humana, ora comensal ora oportunista, se em desequilíbrio com o ambiente do hospedeiro. *Croton urucurana*, ou "Sangra d'água", tem aplicações medicinais largamente aplicadas pela medicina popular, mas que ainda requerem estudos quanto a sua eficácia e segurança. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi analisar a ação gerada pelo extrato de *C. urucurana* em *C. albicans* e sua potencial atividade citotóxica em células humanas. Para isso, foi obtido o extrato hidroalcoólico de *C. urucurana*, com rendimento de 5,24%. A partir do método colorimétrico com o emprego de resazurina em placa de microtitulação, que age nas mitocôndrias, obteve-se uma concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de 375 mg/mL, a mesma encontrada na presença do ergosterol, um componente da membrana plasmática fúngica. Além disso, foi testado o crescimento do fungo na coexistência com sorbitol, um protetor osmótico, o que elevou a CIM para 1.500 mg/mL. A fim de avaliar a citotoxicidade do extrato em células humanas normais, utilizou-se células de fibroblastos pulmonares, cuja CIM foi de 375mg/mL. Enquanto resultados, constatou-se que o extrato hidroalcoólico de *C. urucurana* é danoso à atividade mitocondrial e à parede celular de *C. albicans*, contudo, sem deleção sobre a membrana celular. Mais ainda, apresenta-se citotóxico às células humanas nas mesmas concentrações que para as células fúngicas. Assim, o extrato de *C. urucurana* apresenta atividade antifúngica com baixa seletividade, sem segurança suficiente à utilização enquanto antifúngico.

PALAVRAS-CHAVE: *Candida albicans*. Candidíase. *Croton urucurana*. Fitoterapia.

ABSTRACT

Candida albicans is a polymorphic diploid fungi found in normal human microbiota, at times commensal at times opportunistic. *Croton urucurana*, or "Sangra d'água", has therapeutic applications used in medical treatments throughout common cultures, whilst require further developments of its use with efficiency and safety in human conditions. Thus, the current project aims to analyze the action tool of *C. urucurana* and its outcomes on *C. albicans*, as well as its cytotoxic activity in human cells. Thereunto, the hydroalcoholic extract of *C. urucurana* was obtained with an income of 5,24%. From using the colorimetric method with resazurin in a microtiter plate, which has mitochondrial effects, it was obtained a minimum inhibitory concentration (MIC) of 375 mg/mL of the extract, the same found in the presence of ergosterol, a component of the fungal plasmatic membrane. Furthermore, the growth of *C. albicans* in coexistence with additional sorbitol, an osmotic protector, was tested, raising the minimum inhibitory concentration to 1,500 mg/mL. In order to evaluate the cytotoxicity of *C. urucurana*, lung fibroblasts were used ensuing in an extract MIC of 375mg/dL. As results, it was found the extract can damage the fungal mitochondrial activity and the cell's wall, although with no deleterious effects on the cell's membrane. Moreover, with the same tested concentrations in fungal cells, it was established its human cells cytotoxicity. Thereby, it was figured that *C. urucurana* has antifungal activity with low selectivity and so is not applicable to testing as a potential antifungal drug.

KEYWORDS: *Candida albicans*. Candidiasis. *Croton urucurana*. Herbal Medicine.

RESUMEN

Candida albicans es un hongo diploide, polimórfico, presente en la microbiota humana normal, a veces comensal u oportunista, si está en desequilibrio con el entorno del huésped. *Croton urucurana*, o "Sangra d'água", tiene aplicaciones medicinales ampliamente aplicadas por la medicina popular, pero que aún requieren estudios en cuanto a su eficacia y seguridad. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar la acción generada por el extracto de *C. urucurana* en *C. albicans* y su potencial actividad citotóxica en células humanas. Para ello se obtuvo el extracto hidroalcohólico de *C. urucurana*, con un rendimiento del 5,24%. A partir del método colorimétrico con el uso de resazurina en placa de microtitulación, que actúa sobre las mitocondrias, se obtuvo una concentración inhibitoria mínima (CMI) del extracto de 375 mg/mL, la misma encontrada en presencia de ergosterol, componente de la membrana plasmática fúngica. Además, se probó el crecimiento del hongo en coexistencia con el sorbitol, un protector osmótico, lo que elevó la CMI a 1.500 mg/mL. Para evaluar la citotoxicidad del extracto en células humanas normales, utilizamos células de fibroblastos pulmonares, cuya CMI fue de 375 mg/ml. Como resultado, se encontró que el extracto hidroalcohólico de *C. urucurana* es perjudicial para la actividad mitocondrial y la pared celular de *C. albicans*, sin embargo, sin delección en la membrana celular. Además, es citotóxico para las células humanas en las mismas concentraciones

que para las células fúngicas. Así, el extracto de C. urucurana presenta actividad antifúngica con baja selectividad, sin la seguridad suficiente para su uso como antifúngico.

PALABRAS CLAVE: *Candida albicans. Candidiasis. Croton urucurana. Fitoterapia.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS.....	9
3.1 Objetivo geral.....	9
3.2 Objetivos específicos	9
3. METODOLOGIA	10
3.1 Local do estudo	10
3.2 Local e coleta do material vegetal.....	10
3.3 Obtenção do extrato hidroalcoólico de <i>C. urucurana</i>	10
3.4 Cultivo e manutenção do fungo <i>C. albicans</i>	11
3.5 Avaliação do dano mitocondrial de <i>C. albicans</i> causado por <i>C. urucurana</i> e sua concentração inibitória mínima.....	11
3.6 Avaliação de danos na parede celular de <i>C. albicans</i> causado por <i>C. urucurana</i>	11
3.7 Avaliação do dano à membrana plasmática causado por <i>C. urucurana</i> em <i>C. albicans</i>	11
3.8 Avaliação do dano às células humanas causado por <i>C. urucurana</i>	12
4. RESULTADOS.....	13
4.1 Rendimento do extrato hidroalcoólico de <i>C. urucurana</i>	13
4.2 Avaliação dos danos causados por <i>C. urucurana</i> em <i>C. albicans</i>	13
4.3 Avaliação da citotoxicidade do <i>C. urucurana</i> em células humanas.....	13
4.4 Índice de seletividade de <i>C. urucurana</i>	14
5. DISCUSSÃO.....	15
5.1 Rendimento do extrato hidroalcoólico de <i>C. urucurana</i>	15
5.2 Avaliação dos danos causados por <i>C. urucurana</i> em <i>C. albicans</i>	15
5.3 Avaliação da citotoxicidade de <i>C. urucurana</i> em células humanas.....	16
6. CONCLUSÃO.....	19
7. REFERÊNCIAS.....	20

1. INTRODUÇÃO

Candida albicans é um fungo diploide e polimórfico, que estabelece uma relação de comensalismo com o hospedeiro, habitando, primariamente, o trato gastrointestinal, a microbiota vaginal, a uretra e os pulmões.^{1,3} A infecção manifesta da *C. albicans* denomina-se candidíase. Essas leveduras podem se tornar patogênicas devido a um desequilíbrio na relação micro-organismo/hospedeiro, em razão do comprometimento do sistema imune e dos fatores de virulência do fungo. Entre as propriedades intrínsecas ao micro-organismo, destacam-se a aderência a células do hospedeiro, a produção e secreção de enzimas hidrolíticas, proteinases e fosfolipases, assim como sua capacidade de transição morfológica entre levedura e filamento.²

Tendo em vista o potencial deletério da candidíase, tem-se quatro subformas de relevância epidemiológica no contexto brasileiro: candidíase vulvovaginal, oral, esofágica e sistêmica. Nesse contexto, o quadro clínico dessas infecções é bastante espectral. A candidíase pode manifestar-se de forma assintomática ou com os mais variados sintomas, como secreção vaginal esbranquiçada, prurido vulvar intenso, acometimento parcial ou total de mucosas, erupção cutânea, comprometimento ocular, entre outros.⁴

Geralmente, os diagnósticos são feitos com o exame físico e o manejo de culturas em que há identificação de *C. albicans*.^{4,5} No que tange ao tratamento dessa patologia, tem-se o miconazol ou nistatina em creme vaginal como primeira linha para a candidíase vulvovaginal. Para a infecção oral, recomenda-se nistatina em uso tópico como primeira escolha e, para candidíase esofágica, cetoconazol via oral. Em casos de candidemia (candidíase sistêmica), recomenda-se tratamento com equinocandina para acometimentos graves e, para pacientes clinicamente estáveis, fluconazol como primeira opção e anfotericina B como segunda.⁶

De acordo com Butler⁷, os produtos naturais, sejam de origem animal, vegetal ou mineral, têm sido utilizados desde a Antiguidade para o tratamento de diversos tipos de doenças na humanidade. Até o final do século XIX, todos os medicamentos disponíveis para o tratamento de doenças eram extratos brutos ou semi-puros de plantas, micro-organismos, animais e minerais.⁷ Além disso, os fitoterápicos possuem um grande índice de aceitação e confiabilidade popular. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1980, 80% da população mundial confiava no uso desses produtos para o tratamento de afecções à saúde.^{8,9}

Croton urucuruna, popularmente conhecida como “Sangra d’Água”, é uma árvore da família das euforbiáceas, encontrada principalmente no Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina.¹⁰ O possível efeito medicinal dessa planta vem sendo evidenciado em sua utilização por tribos indígenas, principalmente para o tratamento de feridas infectadas.¹¹ Diante dessa nova perspectiva, a planta vem apresentando várias aplicações medicinais devido aos seus efeitos anti-inflamatório, analgésico, cicatrizante, antidiarreico, antibacteriano e antifúngico. No entanto, faz-se necessário mais estudos para explicar o mecanismo de ação pelo qual *C. urucuruna* exerce seus efeitos.¹²

É importante destacar que diversos fatores apontam para a crescente necessidade de novos antifúngicos, como o aparecimento de isolados multirresistentes, alta toxicidade e/ou baixa disponibilidade de alguns fármacos do arsenal terapêutico. Nesse cenário, inúmeras plantas são

utilizadas pela população para o tratamento de doenças fúngicas, porém a eficácia e segurança desses extratos têm sido pouco estudadas, se restringindo ao uso *off-label*. Dessa forma, percebe-se a relevância de avaliar a atividade antifúngica de *C. urucurana*, para determinar sua viabilidade no tratamento de infecções por *C. albicans*. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi analisar a ação gerada por *C. urucurana* em *C. albicans* e sua atividade citotóxica em células humanas normais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar o tipo de ação gerada por *C. urucurana* em *C. albicans* e analisar a atividade citotóxica da planta em células humanas normais.

2.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato hidroalcolólico de *C. urucurana*.
- Estimar o dano citológico causado por *C. urucurana* em *C. albicans*.
- Demonstrar as possíveis alterações citológicas e moleculares causadas em células humanas por *C. urucurana*.

3. METODOLOGIA

3.1 Local do estudo

As análises ocorreram no Laboratório de Microbiologia da Universidade Evangélica de Goiás (LABBAS - UniEVANGÉLICA), no Laboratório de Química da Universidade Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA e no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás- UFG.

3.2 Local e coleta do material vegetal

As amostras da *C. urucurana* foram coletadas no Bairro Anápolis City, na cidade de Anápolis-GO, nas coordenadas geográficas (latitude -16.3265518, longitude - 48.9349331). Após o acesso à árvore, foi medida sua circunferência com uma fita métrica com a finalidade de estimar a idade da árvore, que, nesse caso, foi uma árvore jovem, com cerca de 5 a 10 anos. A entrecasca da árvore foi colhida em várias lascas, manualmente, com o uso de um facão. A porção do tronco de interesse da pesquisa é facilmente identificada através da resina de coloração vermelho vivo, sendo característico de *C. urucurana*.¹³

Após a coleta, foi borrifado álcool 70% em ambos os lados das lascas de entrecasca, para eliminar bactérias decompositoras que potencialmente poderiam colonizar a amostra e prejudicar os resultados da pesquisa. O material foi acondicionado em prensa formada por folhas de jornal, disposto em ambiente arejado, sob luz natural, com incidência direta de luz solar somente nos horários antes de 10 horas da manhã e após as 16 horas. O processo de secagem das lascas de entrecasca foi por 4 dias.¹³

3.3 Obtenção do extrato hidroalcoólico de *Croton urucurana*

A obtenção do extrato de *C. urucurana* seguiu o preconizado por Moraes¹³, com modificações, por se tratar de espécies diferentes de plantas, mas equivalentes quanto à marcha analítica. Após as lascas de entrecasca estarem secas, foram quebradas manualmente e, posteriormente, trituradas no liquidificador industrial. Após esse processo, foi obtida a amostra bruta, denominada extrato sólido, que foi transferida para um béquer e pesada em uma balança analítica, totalizando 53,77g. Em seguida, foram adicionados à amostra 300 mL de etanol 99%, com a finalidade de extração tanto dos compostos polares quanto apolares da planta. A mistura foi armazenada em uma geladeira por um período de 24 horas e, posteriormente, retirada e submetida a um processo de separação de mistura.¹³

A fim de realizar a filtração, foi utilizada uma peneira para retenção da parte sólida (cascas da planta trituradas) e a parte líquida (álcool e os compostos da planta) foi recolhida em um béquer. Esse processo foi realizado até a total separação do extrato em etanol e cascas trituradas, sendo estas descartadas ao final do processo. Após a separação, o conteúdo líquido foi novamente armazenado em geladeira, por adicionais 24 horas. A seguir, foi transferido para um balão volumétrico

e colocado no rotaevaporador a 80 rotações por minuto e a 40 °C, para que todo o solvente fosse retirado. Em seguida, o extrato hidroalcolóico foi pesado em balança analítica, obtendo-se 2,82g.¹⁴

3.4 Cultivo e manutenção do fungo *Candida albicans*

Para a realização do cultivo, a cepa de *C. albicans* ATCC (American Type Culture Collection - 22019) foi cultivada em meio Ágar Sabouraud Dextrose (Peptona 10g/L; Dextrose 40g/L; Ágar 15g/L). A cepa de *C. albicans* ATCC foi mantida em estufa a 36 °C por 72 horas e, posteriormente, submetida à experimentação ou novo repique.¹⁴

3.5 Avaliação do dano mitocondrial de *Candida albicans* causado por *Croton urucurana* e sua concentração inibitória mínima

O método colorimétrico com o emprego de resazurina foi utilizado para avaliar a viabilidade das células de *C. albicans*, em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), após o tratamento com diferentes concentrações de extrato de *C. urucurana*, cuja viabilidade celular foi medida pela atividade da enzima mitocondrial desidrogenase das células vivas. Para o ensaio, 1×10^4 células/mL fúngicas foram adicionadas à placa de microtitulação de 90 poços, na presença de extrato de *C. urucurana* e incubadas a 37 °C. Após incubação por 24 horas, foram adicionados 20 µL de resazurina (solução à 0,01%), em que a placa novamente incubada por mais 24 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato que inibiu 100% do crescimento fúngico foi determinada por leitura visual, através do impedimento da conversão da cor azul do corante para a rosa. Os ensaios foram realizados em triplicata.^{15,16}

3.6 Avaliação de dano à parede celular de *Candida albicans* causado por *Croton urucurana*

O ensaio para avaliação dos possíveis danos à parede celular promovidos por *C. urucurana* nas células de *C. albicans* foi realizado conforme descrito por Turecka¹⁷, com modificações, em que foi empregado uma maior quantidade de células e um tempo de incubação de 48 horas, mas de acordo com a mesma marcha analítica. De um total inicial de 90 poços da placa de microtitulação, 27 tinham o adicional de 0,8M de sorbitol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) à mistura do extrato com o fungo. Baseado na capacidade do sorbitol de atuar como protetor osmótico da parede celular fúngica, valores maiores de CIM observados em meios com adição de sorbitol demonstram a parede celular como um dos possíveis alvos celulares de *C. urucurana*. Os ensaios foram realizados em triplicata.¹⁷

3.7 Avaliação de dano à membrana plasmática de *Candida albicans* causado por *Croton urucurana*

O ensaio para avaliação dos possíveis danos à membrana plasmática promovidos por *C. urucurana* nas células de *C. albicans* foi realizado conforme descrito por Hilal-Dandan¹⁸, com modificações, com o emprego de uma maior quantidade de células e tempo de incubação de 48 horas, mas de acordo com a mesma marcha analítica. Visto isso, partindo de um total inicial de 90 poços da

placa de microtitulação, 27 tinham o adicional de 400 mg/mL de ergosterol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), sob as mesmas condições descritas anteriormente. O ergosterol foi previamente diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), aquecido e filtrado em filtro de 0,22 µm. Fundamentado no fato de que a membrana plasmática das células fúngicas é composta de ergosterol, valores maiores de CIM observados em meios com adição de ergosterol implicam em uma maior utilização do ergosterol exógeno por *C. albicans* para compensar danos à membrana plasmática. Os ensaios foram realizados em triplicata.¹⁸

3.8 Avaliação do dano às células humanas causado por *C. Urucurana*

Um total de 1×10^5 células/mL de MRC-5 (ATCC CCL-17) foi distribuído em microplacas de 96 poços, em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementadas com soro fetal bovino e antibiótico. As células foram cultivadas na presença de várias concentrações de *C. urucurana* seriadas por 48 horas, em estufa úmida com 5% de CO₂, a 37 °C. Posteriormente, 20 µL de uma solução de resazurina 0,02% foram adicionados a cada micropoço, submetidos à incubação por mais 24 horas, nas mesmas condições descritas acima. A citotoxicidade foi determinada visualmente observando a mudança de azul para rosa. O índice de seletividade dos compostos foi calculado dividindo a concentração citotóxica em células MRC-5 pela CIM.¹⁹

4. RESULTADOS

4.1 Rendimento do extrato hidroalcoólico de *Croton urucurana*

A partir de 53,77g de entrecasca, foram obtidas 2,82g de extrato hidroalcoólico. Desse modo, o percentual de rendimento de extrato foi de 5,24%, como ilustrado na Tabela 1.

Espécie	Material	ES(g)	EE (g)	Rendimento (%)
<i>C. urucurana</i>	Entrecasca	53,77	2,82	5,24

ES= Extrato sólido; EE= Extrato etanólico

Tabela 1. Rendimento de extrato de *C. urucurana*

4.2 Avaliação dos danos causados por *Croton urucurana* em *Candida albicans*

Nos poços da placa de microtitulação somente com o meio de cultura, o extrato hidroalcoólico da planta e as células do fungo, a CIM em que houve atividade da enzima desidrogenase mitocondrial do fungo foi de 375 mg/mL, como demonstrado na Tabela 2. Entretanto, verifica-se que para as células de *C. albicans* cultivadas na presença do adicional de sorbitol, a CIM foi de 1500 mg/mL. Por outro lado, em relação ao dano à membrana plasmática, não foi observado valores maiores de CIM no meio com ergosterol, mantendo-se 375 mg/mL.

Meio	CIM
RPMI + <i>C.urucurana</i> + <i>C. albicans</i>	375 mg/mL
RPMI + <i>C.urucurana</i> + <i>C. albicans</i> + sorbitol	1.500 mg/mL
RPMI + <i>C.urucurana</i> + <i>C. albicans</i> + ergosterol	375 mg/ML

Tabela 2. Concentrações inibitórias mínimas em diferentes meios testados.

4.3 Avaliação da citotoxicidade de *Croton urucurana* em células humanas

A CIM em que o extrato de *C. urucurana* se demonstrou citotóxico em células humanas foi de 375 mg/mL.

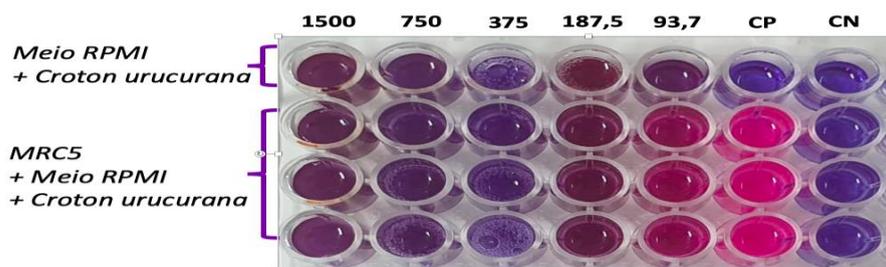


Figura 1. Citotoxicidade em células de fibroblastos MRC-5. CP - Controle Positivo (meio + célula), CN - Controle Negativo (apenas meio). As concentrações de *C. urucurana* estão em mg/mL

4.4 Índice de seletividade de *Croton urucurana*

O índice de seletividade foi calculado conforme descrito por Silva²⁰, por meio da fórmula $IS = CC$ (concentração citotóxica)/ CIM (concentração inibitória mínima), ou seja, $IS = 375/375 = 1$, demonstrando um índice de seletividade baixo.²⁰

$$IS = \frac{CC}{CIM} = \frac{375}{375} = 1$$

5. DISCUSSÃO

5.1 Rendimento do extrato hidroalcoólico de *Croton urucurana*

As técnicas de extração e a natureza do solvente extrator interferem diretamente nos rendimentos e no teor de metabólitos do extrato, podendo influenciar as atividades biológicas e farmacológicas.²¹ Os métodos extrativos para vegetais são diversos e incluem maceração, infusão, percolação, decocção, dentre outros. Além da diversidade do procedimento de extração, há outros fatores que influenciam esse processo, como a porção do material vegetal utilizada, a origem desse material, o grau de processamento, o tamanho da partícula, o solvente utilizado e sua concentração, o tempo de extração, a temperatura e a polaridade.²²

Em comparação com outras pesquisas de objetivos semelhantes, percebe-se diferenças em relação ao rendimento obtido pela amostra. No trabalho de Monteiro²³, foi visto um rendimento de 8,2%, em comparação com o de 5,24% encontrado nesta pesquisa. Ao se analisar as metodologias de cada estudo, a fim de encontrar razões que explicassem essa discrepância de rendimentos, visto que aquele foi um dos trabalhos que serviu de orientação metodológico para a execução deste, o principal item encontrado foi o tempo de extração da amostra no etanol. Enquanto o material desta pesquisa foi extraído em álcool etílico por 48 horas, foram extraídos por 72 horas, nos outros analisados. Todas as outras etapas de obtenção do extrato foram equivalentes.

Adiante, o solvente orgânico utilizado para a extração pode ser admitido como outro fator discrepante que possa explicar a diferença entre os percentuais de rendimentos obtidos,. Nos trabalhos de Peres²⁵, de Wolff²⁶ e de Barbieri²⁷, foi-se utilizado como solvente o metanol ao invés de etanol, obtendo-se rendimentos de 2,93%, 11,25% e 14,32%, respectivamente. Por outro lado, o trabalho de Casão²⁸ utilizou como extrator também o etanol, em semelhança a este, mas com volume de 95% e não de 99%, obtendo rendimento de 6,44%.

Ainda que alguns dos estudos utilizados como referência tenham apresentado rendimentos distintos do nosso, este trabalho optou por seguir a metodologia proposta pelo estudo de Pacheco¹⁴, em que 24 horas foram suficientes para extrair uma quantidade satisfatória de compostos da entrecasca de *C. urucurana*. Vale ressaltar também que estudos como o de Zuchinalli²⁴ obtiveram rendimentos semelhantes ao desta pesquisa e conseguiram resultados efetivos.

5.2 Avaliação dos danos causados por *Croton urucurana* em *Candida albicans*

Para o estudo da ação de *C. urucurana* na parede celular de *C. albicans*, foi realizado um ensaio com sorbitol, protetor osmótico que estabiliza os protoplastos fúngicos. As células que são protegidas por esse álcool de açúcar podem crescer na presença de compostos antimicrobianos que agem na síntese da parede celular fúngica, ao passo que, comparativamente, o crescimento seria inibido na ausência de sorbitol. Sabe-se que o aumento da CIM nos experimentos com esse poliálcool pode indicar que a parede celular do fungo é um potencial alvo de ação do composto.¹⁶

Nessa perspectiva, foi demonstrado que o extrato de *C. urucurana*, quando cultivado na presença de sorbitol, apresentou um aumento das condições normais da CIM de 375 mg/mL para 1500

mg/ml, ou seja, as células ficaram mais resistentes à ação antifúngica de *C. urucurana*. Infere-se, portanto, que um dos danos citotóxicos é referente à parede celular de *C. albicans*.

A fim de avaliar o possível efeito antifúngico de *C. urucurana* na membrana celular do microorganismo, foi analisada a capacidade do composto testado de formar complexos com o ergosterol. O ergosterol é um esterol que faz parte da composição da membrana celular fúngica, exclusivamente, o que o torna, portanto, um alvo farmacológico de interesse.¹⁶

O ensaio foi realizado com o objetivo de determinar se o extrato hidroalcoólico se liga ao ergosterol da membrana celular de *C. albicans*. Se o composto analisado interagir com o ergosterol da membrana, um aumento do valor da CIM pode ser observado. Esse mecanismo ocorre devido a uma ligação da substância testada ao ergosterol livre, de forma que uma maior concentração do composto será necessária para inibir o crescimento fúngico.¹⁶ Nesse sentido, não foram observados valores maiores de CIM no meio com ergosterol, o que sugere que a *C. urucurana* não apresenta esse tipo de atividade em *C. albicans*.

Em relação à avaliação do dano mitocondrial, foi optado pelo teste colorimétrico de redução por resazurina. Tem-se que essa substância é um indicador redox com permeabilidade celular, que pode ser dissolvida em tampões fisiológicos, cujo resultado é uma solução de coloração azul, que pode ser adicionada diretamente às células em cultura. Nesse sentido, as células viáveis com metabolismo ativo reduzem a resazurina no produto resorufina, que é rosa fluorescente. Assim, a resazurina é consequentemente reduzida nas mitocôndrias, o que torna o teste colorimétrico útil, barato e sensível para o estudo da atividade metabólica mitocondrial.¹⁸

Foi analisado ainda, que na concentração de 375 mg/mL, as células de *C. albicans* tiveram a sua atividade mitocondrial prejudicada, sem a alteração colorimétrica de azul para rosa. Infere-se, portanto, que *C. urucurana* apresenta efeitos danosos à atividade mitocondrial fúngica.

Ao se descrever os locais de ação da planta, cabe compara-los com os locais apresentados pelos medicamentos do esquema tradicional de tratamento de candidíase. As principais opções de medicamentos são miconazol, nistatina, fluconazol e anfotericina B.⁶ Todos esses medicamentos agem na membrana celular, comprometendo a ação citotóxica dos fungos.¹⁷ Dessa maneira, como foi exposto anteriormente, afirma-se que a *C. urucurana* possui local e mecanismo de ação diferentes dos principais medicamentos do esquema tradicional utilizado.

5.3 Avaliação da citotoxicidade de *Croton urucurana* em células humanas

De acordo com o ensaio *Antifungal activity of Copaíba resin oil in solution and nanoemulsion against Paracoccidioides spp*, realizado por Silva²⁰, a redução de resazurina foi usada para investigar a citotoxicidade que o extrato hidroalcoólico possui em células de fibroblasto MRC-5. A partir disso, o resultado é baseado na redução do corante indicador, resazurina, à resorufina altamente fluorescente por células viáveis, o que serve como comparativo aos nossos resultados.

A partir desta marcha analítica, foi constatado na presente pesquisa que, ao se usar uma concentração de células de MRC-5 de 1×10^5 células/mL, a concentração em que o extrato de *C. urucurana* se demonstrou citotóxico em células humanas é de 375 mg/mL, ou seja, condição em que as células humanas tornaram-se inviáveis, ao perder rapidamente a capacidade metabólica de reduzir

a resazurina e a não produzir sinal fluorescente. Considerando que a CIM em *C. albicans* foi a mesma, pode-se constatar que, apesar da *C. urucurana* apresentar atividade antifúngica, oferece toxicidade ao MRC-5.

Além disso, através do cálculo do índice de seletividade (IS), foi demonstrado que *C. urucurana* apresenta um IS baixo. Sabe-se que o objetivo desse índice é estimar uma possibilidade de relação entre o ensaio *in vitro* e a passagem segura para ensaio *in vivo* de compostos sintéticos ou naturais.²⁹

À vista disso, foi considerado que, quanto maior o valor do IS, o agente analisado é mais promissor contra um dado micro-organismo, por apresentar menor efeito citotóxico em células humanas. Por outro lado, quando apresentam valores com IS baixos, possuem maior citotoxicidade e baixa prioridade para atividade antimicrobiana, como foi observado nesta pesquisa. Portanto, *C. urucurana* não apresenta uma margem de segurança confiável e demonstrável que permita a utilização da concentração de entrecasca escolhida enquanto potencial fármaco antifúngico no tratamento de candidíase em humanos.²⁹

Assim, pode-se constatar que o potencial princípio ativo obtido a partir de extrato e reduções da entrecasca de *C. urucurana* apresenta uma janela de segurança pequena e, portanto, inviável à continuidade de desenvolvimento desse estudo em consonância com os parâmetros propostos. Então, faz-se relevante indagar sobre a comparação a outros medicamentos, bem como tentar estipular quais fatores podem ter influenciado o resultado desfavorável de citotoxicidade e se, quando alterados, poderiam modificar o cenário de continuidade da avaliação do dano e, igualmente, de atividade antifúngica aplicável a testes em humanos.

Acerca do comparativo com medicamentos, ressalta-se o miconazol, cuja concentração citotóxica na qual se observam efeitos em células humanas é muito superior à concentração mínima em fungo, o que descarta um potencial citotóxico de relevância. Dessa forma, percebe-se que os medicamentos do esquema tradicional possuem CIM em *C. albicans* bem menores, com um potencial de citotoxicidade inferior quando comparado a *C. urucurana*.³⁰ Ou seja, esses fármacos seriam mais eficazes com uma citotoxicidade humana menor ou até mesmo insignificante, o que pode dificultar a utilização da Sangra d'Água como um futuro medicamento no tratamento da candidíase.

A fim de servir como preditor científico para pesquisas futuras, propõe-se que haja uma investigação científica que se baseie em análises clínicas mais aprofundadas consoantes à avaliação laboratorial dos danos, bem como novas tentativas de utilização de amostras de regiões distintas da *C. urucurana*, como a folha e o látex, com um direcionamento do estudo para índices mitóticos capazes de modificar o efeito citotóxico exercido por moléculas.

Por fim e nomeadamente, tem-se a necessidade de promover à população uma educação, ainda que somente verbalizada, de que o imaginário coletivo sobre o potencial fitoterápico de plantas conhecidas delega arbitrariedade de utilização sem precedentes e de forma generalizada, em contraste aos repetitivos e deletérios ditos "natural não faz mal". A Sangra d'Água é empregada tradicionalmente para vários fins, como antibiótico, analgésico, anti-inflamatório, cicatrizante, entre outros.³¹ Contudo, neste estudo, apesar de ter apresentado atividade antifúngica, *C. urucurana* também apresentou potencial de toxicidade em humanos, o que ilustra um escopo de restrição a seu uso. Outros estudos,

como o de Mesquita³², mostraram adicionais efeitos citotóxicos, por exemplo, inibição de atividade mitótica.

No entanto, deve-se considerar que este estudo realizou os testes de citotoxicidade usando a linhagem de células MRC-5, ou seja, de tecido pulmonar. Logo, existe a possibilidade de que em outros tecidos/linhagens de células, os efeitos citotóxicos sejam diferentes. Além disso, também pode servir como preditor para estudos seguintes analisarem *C. urucurana* como um potencial fármaco tópico, já que, nessa forma, possivelmente não apresentaria efeito nos tipos de células aqui analisados. Deve-se, pois, que mais estudos com análise ampliada dos mecanismos de ação e de seu potencial enquanto fármaco sejam realizados.

6. CONCLUSÃO

Foi demonstrado, portanto, que o extrato hidroalcoólico de *C. urucurana* inibe o crescimento de células leveduriformes de *C. albicans* de modo dose-dependente, com efeitos danosos à atividade mitocondrial fúngica e à parede celular, contudo sem efeitos deletérios sobre a membrana plasmática. Nesse sentido, foi demonstrado, ainda, que a *C. urucurana* apresenta efeito citotóxico em células humanas em uma mesma concentração inibitória mínima com citotoxicidade em células fúngicas.

Logo, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos posteriores que analisem os danos estabelecidos pela presente pesquisa de forma comparativa e também outros potenciais mecanismos de ação citotóxica fúngica. Desse modo, são almejadas pesquisas com maior número de evidências e esclarecimentos pontuais acerca do espectro de efeitos antifúngicos de *C. urucurana*. Além disso, é relevante considerar a possibilidade de testagem de outros compostos da planta, como látex ou mesmo moléculas isoladas do extrato vegetal, visto que esses dois novos parâmetros poderiam aumentar o índice de seletividade. Assim, abriria-se a possibilidade de alcance de menores concentrações inibitórias mínimas em fungos e maiores concentrações citotóxicas em células humanas, o que culminaria em uma utilização do composto de forma mais segura e, por conseguinte, de possibilidade promoção enquanto fármaco candidato antifúngico.

7. REFERÊNCIAS

1. Alonso-Valle H, Acha O, García-Palomo JD, Fariñas-Álvarez C, Fernández-Mazarrasa C, Fariñas MC. Candidemia in a Tertiary Care Hospital: Epidemiology and Factors Influencing Mortality. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2003;22(4):254–257. <https://doi.org/10.1007/s10096-003-0890-x>
2. Lima TD, de Fatima Lisboa Fernandes O, Hasimoto e Souza LK, Passos XS, Rodrigues Silva M do R. Candida albicans DE MUCOSA VAGINAL: MORFOTIPAGEM E PRODUÇÃO DE PROTEINASE. *Revista de Patologia Tropical*. 2008;33(1). <https://doi.org/10.5216/rpt.v33i1.3190>
3. Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2010;46(3):225–234. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442010000300009>
4. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;62(4):e1–e50. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
5. Revankar SG. Candidíase (invasiva). Manual MSD Versão para Profissionais de Saúde. [Manual]; 2017.
6. Secretaria de vigilância em saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) - Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST). [Manual]. Brasília: Ministério da Saúde; 2020.
7. Butler MS. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products*. 2004;67(12):2141–2153. <https://doi.org/10.1021/np040106y>
8. Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ*. 1985;63(6):965-81. PMID: 3879679; PMCID: PMC2536466.
9. Sardi SP, Clarke J, Viel C, Chan M, Tamsett TJ, Treleaven CM, Bu J, Doce L., Passini MA, Dodge JC. Aumentando a atividade da glicocerebrosidase do SNC como uma estratégia terapêutica para parkinsonismo e outras sinucleinopatias relacionadas a Gaucher. *Proc. Nacional Acad. ciência EUA*. 2013;110:3537–3542.
10. Cândido-Bacani P de M, Figueiredo P de O, Matos M de FC, Garcez FR, Garcez WS. Cytotoxic Orbitide from the Latex of *Croton urucurana*. *Journal of Natural Products*. 2015;78(11):2754–2760. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00724>
11. Simionatto E, Bonani VFL, Morel AF, Poppi NR, Raposo Júnior JL, Stuker CZ, Peruzzo GM, Peres MTL, Hess SC. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2007;18(5):879–885. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000500002>
12. Cordeiro KW, Felipe JL, Malange KF, do Prado PR, de Oliveira Figueiredo P, Garcez FR, de Cássia Freitas K, Garcez WS, Toffoli-Kadri MC. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016;183:128–135. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.051>
13. Moraes T, de Araújo M, Bernardes N. de Oliveira D, Lasunskaja E, Muzitano M, da Cunha M. Antimycobacterial Activity and Alkaloid Prospection of *Psychotria* Species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic Rainforest. *Planta Medica*. 2011;77(09):964– 970. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250656>
14. Pacheco DDR, Emanuelle Dâmaso Soares D, Silva Neto CDM, da Silva GA, do Prado RS. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Curcuma longa* SOBRE *Candida parapsilosis*. *Revista de Patologia Tropical*. 2015;44(3). <https://doi.org/10.5216/rpt.v44i3.38022>

15. Vasconcelos L.C de, Sampaio FC, Albuquerque A de J. dos R, Vasconcelos L.C de S. Cell Viability of *Candida albicans* Against the Antifungal Activity of Thymol. *Brazilian Dental Journal*. 2014;25(4):277–281. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300052>
16. Riss TL. Cell Viability assays. *Assay Guidance Manual*. [Manual]; 2014.
17. Turecka K, Chylewska A, Kawiak A, Waleron KF. Antifungal Activity and Mechanism of Action of the Co(III) Coordination Complexes With Diamine Chelate Ligands Against Reference and Clinical Strains of *Candida* spp. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01594>
18. Hilal-Dandan R, Brunton L. *Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman & Gilman*. Porto Alegre: McGraw Hill Education – Artmed; 2015.
19. Gatti THH, Eloy JO, Ferreira LMB, Silva IC da, Pavan FR, Gremião MPD, Chorilli M. Insulin-loaded polymeric mucoadhesive nanoparticles: development, characterization and cytotoxicity evaluation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;54(1). <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000117314>
20. Silva LC, et al. Antifungal activity of Copaíba resin oil in solution and nanoemulsion against *Paracoccidioides* spp. *Brazilia Journal of Microbiology*. 2020;51(1):125-134.
21. Oliveira VB, Zuchetto M, Oliveira CF, Paula CS, Duarte AFS, Miguel MD, Miguel OG. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2016;18(1 suppl 1):230–239. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_106
22. Tiwari P, et al. Phytochemical Screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 2011;1(1):98-106.
23. Monteiro LP. Determinação da Atividade Citotóxica do Extrato Vegetal de *Croton urucurana* Baill em Linhagens De Células Tumerais. [Programa de Pós- Graduação em Bioquímica Aplicada]; Viçosa, Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa; 2015 Brasil. Recuperado de <https://www.redalyc.org/journal/4675/467553545005/html/>
24. Zuchinalli A. Estudo de propriedades químicas e biológicas da espécie vegetal *Croton urucurana*. [Programa de Pós-Graduação em Química]; Florianópolis: Faculdade de Química, Universidade Federal de Santa Catarina; 2009. Recuperado de <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/92591/262753.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
25. Peres MTLP, Monache FD, Cruz AB, Pizzolatti MG, Yunes RA. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 1997;6(3):223–226. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00039-1)
26. Wolff Cordeiro K, Aparecida Pinto L, Nazari Formagio AS, Faloni de Andrade S, Leite Kassuya CA, de Cássia Freitas K. Antiulcerogenic effect of *Croton urucurana* Baillon bark. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012;143(1):331–337. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.044>
27. Barbieri DSV, Tonial F, Lopez PVA, Sales Maia BHLN, Santos GD, Ribas MO, Glienke C, Vicente VA. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*. 2014;9(9):887–896. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.05.006>
28. Casão TDRL, et al. *Croton urucurana* Baillon stem bark ointment accelerates the closure of cutaneous wounds in knockout IL-10 mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2020;261.
29. Protopopova M, Hanrahan C, Nikonenko B, Samala R, Chen P, Gearhart J, Einck L, Nacy CA. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ 109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56:968-974.

30. de Castro IMN, Júnior AA de V, Cunha FA, Cunha M da C dos SO, Menezes EA. Comparação da atividade de antifúngicos imidazólicos e triazólicos frente a *Candida albicans*. RBAC. 2016;216–222.
31. Antoniazzi CA, Botini N, Ascari K, Chaves CF, Añez RB. Estudo etnobotânico de *croton urucurana baill* (euphorbiaceae) na comunidade salobra grande, Porto Estrela-MT. Biodiversidade. 2016:40-52.
32. Mesquita DD, Ciappina AL, Almeida LM. Avaliação do potencial tóxico do látex de *Croton urucuruana*. III Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG. Pirenópolis, Goiás; 2016. Recuperado de <file:///C:/Users/julie/Downloads/8671-Texto%20do%20artigo-25658-1-10-20170405.pdf>