

**AVALIAÇÃO DO DANO CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DE  
EXTRATOS DE *Handroanthus serratifolius* SOBRE *Candida albicans***

CYTOTOXIC AND GENOTOXIC DAMAGE ASSESSMENT OF *H.*  
*serratifolius* EXTRACTS ON *Candida albicans*

**Kayro Feliciano Pereira**

Faculdade de Farmácia, FACER – Unidade de Ceres, Ceres, Goiás, Brasil.  
kayrofeliciano@hotmail.com

**Kymerlly Oliveira Santos**

Faculdade de Farmácia, FACER – Unidade de Ceres, Ceres, Goiás, Brasil.  
kymberllyosantos@hotmail.com

**Amanda Gregorim Fernandes**

Universidade Federal de Goiás, UFG – Goiânia, Goiás, Brasil.  
mandika.greg@yahoo.com.br

**Lívia do Carmo Silva**

Universidade Federal de Goiás, UFG – Goiânia, Goiás, Brasil.  
liviva.lbm.ufg@gmail.com

**Gilmar Aires da Silva**

Faculdade de Farmácia, FACER – Unidade de Ceres, Ceres, Goiás, Brasil.  
gilmaraires@hotmail.com

**Renata Silva do Prado**

Faculdade de Farmácia, FACER – Unidade de Ceres, Ceres, Goiás, Brasil.  
renata.ufg@hotmail.com

**Endereço para correspondência:**

Av. Brasil, S/N, Qd. 13, Setor Morada Verde Ceres – Go. CEP: 763000-000  
Fone: (62) 3323-1040 ; renata.ufg@hotmail.com

## RESUMO

Representantes do gênero *Candida* são classificados como microrganismos oportunistas. A *Candida albicans* faz parte da microbiota normal, mas em estado de desequilíbrio ela é capaz de causar danos. O *Handroanthus serratifolius* é encontrado em várias regiões do Brasil. O interesse de se analisar novos compostos a partir de plantas em busca de novas terapias surge devido ao aparecimento de cepas resistentes aos antifúngicos mais utilizados na atualidade. O objetivo deste trabalho foi verificar a citotoxicidade e a genotoxicidade de extratos de caule e raiz de *H. serratifolius* sobre *C. albicans*. Para análise da citotoxicidade, foi utilizado o teste da redução de tetrazólio e resazurina para avaliar danos mitocondriais. Foi avaliado também o dano morfológico através de microscopia óptica. Testes de concentração inibitória mínima foram realizados na presença de ergosterol e sorbitol. A genotoxicidade foi avaliada pela extração do DNA genômico e posterior corrida eletroforética. De posse dos dados obtidos, foi possível observar que o extrato de caule causa dano mitocondrial ao fungo, nas concentrações que variam de 250 à 500 ppm, e alteração na morfologia celular, promovendo alongamento e formação de grumos das mesmas, conclusão obtida a partir de microscópio óptico; o extrato de raiz causa dano a parede celular do fungo, fato observado a partir do teste de microdiluição seriada e possível dano ao DNA genômico de *C. albicans*. Sendo assim, a capacidade anti-candida dos extratos de *H. serratifolius* foi ratificada, e algumas de suas vias de ação elucidadas, comprovando o potencial do mesmo como candidato a fármaco.

**Palavras-chave:** Microrganismos oportunistas. *Candida*. Caule. Raiz.

## ABSTRACT

The genus *Candida* are classified as opportunistic microorganisms. *Candida albicans* is normal agent of microbiota, but in imbalance it can cause damage. The *Handroanthus serratifolius* is found in various regions of Brazil. The interest in analyzing new compounds from plants for new therapies arises due to the emergence of resistant strains to antifungal agents most commonly used today. Toxicity and genotoxicity stem and root extracts of *H. serratifolius* on the fungus *C. albicans* was found. For the analysis of cytotoxicity, it was used tetrazolium reduction assay (MTT) and analyzes resazurin to assess mitochondrial damage, with the aid of an optical microscope was analyzed, too, the morphological damage. Minimum inhibitory concentration tests were performed on ergosterol and sorbitol. The genotoxicity was assessed by extraction of genomic DNA of *C. albicans*, after exposure to the extracts, and subsequent electrophoretic. In the mais, its can possible to observe that stalk extract cause damage at 250 to 500 ppm and morphology damage too, promoting stretching and grume forming; Root extract causes damage in cell wall, observed by serial microdilution and *C. albicans* DNA damage. Thus, the anti-candida ability of *H. serratifolius* extracts was ratified, and some of its elucidated courses of action, which means that is a potential drug candidate.

**Keywords:** Opportunistic microorganisms. *Candida*. Root. Stalk.

## 1 INTRODUÇÃO

2  
3 As diferentes espécies do gênero *Candida* pertencem ao reino *Fungi*, grupo *Eumycota*,  
4 filo *Ascomycota*, classe *Deuteromycetes* e fazem parte da família, *Cryptococcacea*  
5 (KURTZMAN; FELL, 1998). Representantes do gênero *Candida* são classificados como  
6 microrganismo oportunistas. A espécie mais encontrada em isolados clínicos é a *Candida*  
7 *albicans* (CAMARGO *et al.*, 2008).

8 A *C. albicans* faz parte da microbiota normal, mas em estado de desequilíbrio ela é  
9 capaz de causar danos. É um fungo diplóide e polimórfico que ocasiona diversas patologias  
10 (CHAFFIN *et al.*, 1998), sendo a espécie mais prevalente em pacientes com síndrome da  
11 imunodeficiência adquirida (SIDA) (ALMEIDA *et al.*, 2012). Esta espécie é o principal  
12 patógeno responsável pela maioria das infecções nosocomiais (KARKOWSKA-KULETA *et*  
13 *al.*, 2009).

14 A levedura tem alto potencial de virulência, sendo responsável por processos  
15 patológicos e seu maior fator de virulência é a capacidade de aderência (TAMURA *et al.*,  
16 2007). A *C. albicans* tem a capacidade de transitar da fase miceliana para a fase  
17 leveduriforme, fenômeno conhecido como dimorfismo. Essas alterações são causadas por  
18 variações de temperatura, pH, diferentes fontes de carbono e concentração de CO<sub>2</sub> (SILVA,  
19 2011).

20 As chamadas candidíases são as patologias causadas por representantes do gênero  
21 *Candida*. Segundo estudos, pacientes que passam por longos períodos internados tem maior  
22 probabilidade de romper o equilíbrio do hospedeiro, assim como pacientes em que há  
23 necessidade do uso diário de cateteres, sondas, ou algum tipo de tratamento via parenteral,  
24 estando então mais propensos a desenvolver candidíases (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Segundo  
25 COSTA (2009), de cada treze pacientes que usam cateter, oito apresentaram infecção por *C.*  
26 *albicans*, representado 61,6% destes pacientes.

27 Assim, percebe-se que é preocupante o número de infecções provocadas pela espécie  
28 *C. albicans*, atentando-se para o fato se sua distribuição for mundial, e o seu aumento  
29 progressivo devido à quantidade de transplante de órgãos, casos de Síndrome da  
30 Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e tratamento de neoplasias, tornando altas as taxas de  
31 candidíase sistêmica, infecções em trato gênito-urinário e trato respiratório (NETO *et al.*,  
32 1997).

33 Para o tratamento de candidíase as principais classes de medicamentos utilizados são  
34 os azóis (triazóis), poliênicos (anfotericina B), e equinocadinas (anidulafungina) (DEMITTO

1 *et al.*, 2012). Antifúngicos como cetoconazol, miconazol, fluconazol e itraconazol são  
2 representantes da classe dos azóis e se sobressaem no tratamento da candidíase por possuírem  
3 alta atividade antifúngica (PEDROSO, 2009).

4 Diante do surgimento de leveduras resistentes, os extratos vegetais com atividade  
5 antimicrobiana estão sendo estudados para serem utilizados como terapia alternativa para o  
6 tratamento de infecções fúngicas oportunistas, como a candidíase (MARDEGAN *et al.*,  
7 2006).

8 O ipê amarelo é popularmente conhecido como ipê-ovo-de macuco, ipê pardo ou pau-  
9 d'circo amarelo. A planta pertence à família *Bignoniaceae*, e teve sua nomenclatura científica  
10 mudada de *Tabebuia serratifolius* para *Handroanthus serratifolius* (OLMSTEAD *et al.*,  
11 2007).

12 As plantas da família *Bignoniaceae* possuem vários constituintes químicos com  
13 atividades terapêuticas, a principal classe de compostos químicos do ipê amarelo é a que  
14 compreende naftoquinonas e o principal representante o lapachol (COSTA, 2012). O lapachol  
15 é efetivo na inibição do crescimento de células cancerígenas, bem como apresenta atividade  
16 antimalárica, moluscicida, bactericida tripanocida, leishmanicida entre outras (BARBOSA;  
17 PEREIRA NETO, 2013; TAVARES *et al.*, 2013).

18 Além disso, ALMEIDA e colaboradores (2015) demonstraram a capacidade inibitória  
19 de *H. serratifolius* sobre o fungo *C. albicans*. Neste estudo verificamos a citotoxicidade e a  
20 genotoxicidade de extratos de caule e raiz da referida planta sobre o fungo, em busca de  
21 informação acerca do tipo de dano causado. Foi utilizado o método da redução do tretrazólio  
22 (MTT), assim como análises com resazurina para avaliar danos mitocondriais. Com auxílio de  
23 microscópio óptico analisou-se, também, o dano morfológico. Testes de concentração  
24 inibitória mínima foram realizados na presença de ergosterol e sorbitol para avaliar possíveis  
25 danos à membrana plasmática e parede celular. A genotoxicidade foi avaliada pela extração  
26 do DNA genômico do fungo após exposição aos extratos, e posterior análise do perfil  
27 eletroforético obtido.

28

## 29 **METODOLOGIA**

30

31 Foi realizado um estudo de abordagem indutiva, quali-quantitativo, com procedimento  
32 comparativo estatístico e técnica de documentação direta em laboratório.

33

## 1 **Coleta do material vegetal**

2 A coleta de caule e raízes de *H. serratifolius* foi feita na cidade de São Patrício – GO,  
3 situada na região do Vale do São Patrício. As amostras foram identificadas e reconhecidas por  
4 um botânico. O processo de secagem das amostras foi realizado em esteiras sob a sombra e  
5 temperatura ambiente no laboratório de Multiuso Microbiologia da Facer - Unidade Ceres  
6 (WIGGERS; STANGES, 2008).

## 8 **Obtenção dos extratos de *H. serratifolius***

9 De acordo com ALMEIDA e colaboradores (2015), as raízes (secas a temperatura  
10 ambiente), e caule (secos em estufa a 30°C) de *H. serratifolius* foram pulverizadas, e após  
11 esse processo, armazenados em frasco âmbar contendo metanol (metanol 95%), sob  
12 refrigeração, durante sete dias. Posteriormente, essa amostra foi filtrada e colocada em um  
13 agitador magnético com termostato para a evaporação do solvente. O extrato resultante foi  
14 armazenado em um frasco âmbar ao abrigo da luz, à 4° C.

15

## 16 **Cultivo e manutenção do fungo**

17 Seguindo a metodologia ALMEIDA e colaboradores (2015), para a realização do  
18 cultivo, a cepa de *C. albicans* ATCC (American Type Culture Collection – 90028) foi  
19 cultivada em meio Ágar Sabouraud Dextrose (Peptona 10g/L; Dextrose 40g/L; Ágar 15g/L),  
20 meio recomendado para o cultivo de leveduras e fungos patogênicos. Após a solidificação do  
21 meio, e posterior repique a cepa de *C. albicans* ficou mantida em estufa a 37°C por sete dias,  
22 quando foi submetida à experimentação ou novo repique.

23

## 24 **Investigação do dano morfológico dos diferentes extratos de *H. serratifolius* sobre *C.*** 25 ***albicans***

26 Para se investigar o efeito de extratos de *H. serratifolius* sobre o crescimento de *C.*  
27 *albicans*, amostras contendo  $10^4$  como concentração de células do fungo, com sete dias de  
28 crescimento em ágar sabouroud (Animal tissue 5.00g/l; Beef extract 1.50g/l; yeast extract  
29 1.50g/l; Sadium chlorde 5.00g/; Ágar 15.00g/l; PH final:  $7,4 \pm 0,2$  a 25°C; MARCA:  
30 Himedia) suplementado com glicose, foram transferidas para tubos de ensaios contendo meio  
31 nutriente líquido somado aos extratos de caule e raiz de *H. serratifolius* na concentração de  
32 250 ppm (ALMEIDA et al, 2015). Simultaneamente foi realizado controle negativo na  
33 ausência do extrato composto. Após 7 dias de incubação, o material foi levado ao microscópio

1 óptico, para análise das alterações celulares das leveduras. As imagens foram obtidas por  
2 sistema de captura de imagens em microscópio COLEMAN ac 85-265v (BETONI et al.,  
3 2006).

4

#### 5 **Avaliação da inibição mitocondrial pelo método de redução do tetrazólio (MTT) e teste** 6 **de microdiluição em placas na presença de resaruina**

7 Para avaliar a viabilidade celular de *C. albicans* após tratamento com os extratos de *H.*  
8 *serratifolius*, foi utilizado o método colorimétrico de redução de tetrazólio (MTT). O  
9 princípio deste método descrito por Mosmann (1983) consiste em medir a viabilidade celular  
10 pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Para o teste do MTT,  $1 \times 10^4$  de  
11 células fúngicas foram semeadas em tubos de ensaio na ausência ou presença dos extratos de  
12 caule e raiz da planta a 250 ppm e incubadas em estufa a 37°C. Ao final do período de  
13 incubação, foram adicionados 10 µL de MTT na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup>, e após 4 h de  
14 incubação com o MTT, foram acrescentados 50 µL álcool isopropílico. A quantificação da  
15 densidade óptica (DO) foi medida em espectrofotômetro (Awareness Technology INE/ Stat  
16 Fax 2100). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da seguinte fórmula:

17

18 **% Viabilidade** = Absorbância tratamento/Absorbância Controle x 100 (LIMA et al., 2014).

19

20 Para avaliar a interferência dos extratos de caule e raiz de *H. serratifolius* na atividade  
21 mitocondrial de *C. albicans*, foi realizado o teste de microdiluição em placas, na presença de  
22 250 ppm dos extratos de raiz e caule da planta, bem como  $10^4$  de células fúngicas. Após 24  
23 horas de incubação a 37 °C, retirou-se as placas e foi adicionado 15 µl da solução de  
24 resazurina a 0,2% em cada poço, para avaliação da atividade mitocondrial do fungo, sendo a  
25 placa novamente incubada e após 24 horas foi realizada a captura de imagem. Os ensaios  
26 foram realizados em triplicata e a inibição da atividade mitocondrial foi visualizada pela  
27 manutenção na cor azul do reagente resazurina (ZHANG *et al.*, 2004; ABU-AMERO;  
28 BOSLEY, 2005).

29

#### 30 **Avaliação da ação de *H. serratifolius* na parede celular**

31 Com o objetivo de avaliar a interferência dos extratos de caule e raiz de *H.*  
32 *serratifolius* na parede celular fúngica, foi analisada a influência do sorbitol, que é um  
33 osmoprotetor, no crescimento de *C. albicans* frente aos diferentes extratos da planta. Valores

1 de IC<sub>50</sub> foram determinados, pelo procedimento de microdiluição seriada padrão. Foram  
2 preparadas placas em duplicata contendo diluições de extrato do caule e raiz com  
3 concentrações finais variando de 500 ppm a 31,2 ppm, mais 0,8 M de sorbitol, em cada poço,  
4 como suporte osmótico. Após incubação a 37 ° C, as concentrações inibitórias mínimas  
5 (CIM) foram lidas após 48 h. Este ensaio foi realizado em duplicata e os valores médios  
6 foram calculados (FROST *et. al.*, 1995).

7

### 8 **Avaliação da ação de *H. serratifolius* na membrana plasmática**

9 Para analisar a interferência dos extratos de caule e raiz de *H. serratifolius* sobre a  
10 membrana plasmática de *C. albicans*, foi analisada a influência do ergosterol como  
11 osmoprotetor, no crescimento do fungo frente aos diferentes extratos da planta. Valores de  
12 IC<sub>50</sub> foram determinados, pelo procedimento de microdiluição seriada. Os experimentos  
13 foram conduzidos em duplicata biológica, na presença dos extratos do caule e raiz com  
14 concentrações finais variando de 500 ppm a 31,2 ppm, suplementado com 400 µg/mL de  
15 ergosterol. Após incubação a 37 ° C por 48 horas, a densidade óptica foi capturada (LUNDE  
16 *et. al.*, 2000).

17

### 18 **Extração do DNA genômico de *C. albicans***

19 O DNA genômico de *C. albicans* foi extraído de acordo com as recomendações de  
20 SANDHU e colaboradores (1995), após exposição aos extratos de *H. serratifolius*, na  
21 concentração de 500 ppm (ALMEIDA et al, 2015). Para tal, empregou-se 1 x 10<sup>4</sup> de células  
22 fúngicas diluídas em 200 µl de água deionizada estéril tratada com 1% de dietilpirucarbonato  
23 (H<sub>2</sub>O DEPC). Conseqüente, a esse volume foi adicionado 500 µl de tiocianato de guanidina  
24 6M (GTP) dissolvido em 50 mM de fenol tamponado em Tris-HCl (pH = 8), mantendo a  
25 amostra em banho-maria (105°C) por 20 minutos. Logo, adicionou-se 250 µl de clorofórmio-  
26 álcool-isoamil (24:1) seguida pela centrifugação, por 15 minutos, a 14.000 rpm.  
27 Posteriormente, foi realizada a adição de 500 µl de isopropanol a 100% à fase aquosa,  
28 submetendo a mistura à temperatura de -20°C por 24 horas. Ao final desse período ocorreu  
29 uma nova centrifugação a 14.000 rpm, por 20 minutos, descarte do sobrenadante e adição de  
30 500 µl de etanol a 70%. Seguido com uma nova centrifugação a 14.000 rpm, por 10 minutos,  
31 e ressuspensão do DNA extraído em 25 µl de H<sub>2</sub>O DEPC. Posteriormente, as diferentes  
32 amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose.

## 1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2 A tabela 1 mostra as massas e os rendimentos obtidos dos extratos etanólico para a  
3 espécie *H. serratifolius*, tomadas em relação ao caule e raiz secos.

4

**Tabela 1:** Massa total e rendimentos dos extratos etanólicos de *H. serratifolius*.

<b>Espécie</b>	<b>Extratos</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>EE</b>	<b>Rendimento %</b>
<i>H. serratifolius</i>	Caule	2,0000	0,500 g	25,00 %
	Raiz	2,0000	0,400 g	20,00%

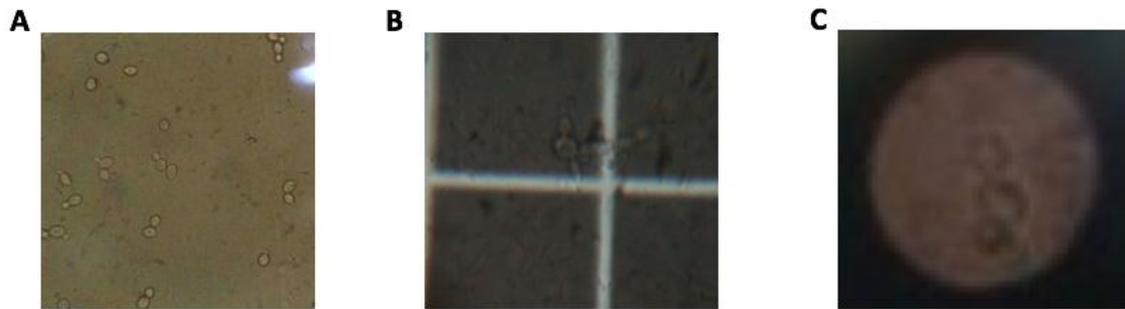
\*EE = Extrato Etanólico

5 Desta forma, para 2g de caule e 2g de raiz da árvore, o percentual de rendimento dos  
6 extratos tem uma média de 22,5%.

7 No estudo de ALMEIDA e colaboradores (2015), foi utilizado 3,6492g de tronco e  
8 3,6112g de raiz com maceração em etanol, o percentual de rendimento desse estudo foi de  
9 27,90% e 25,20%. O que demonstra que a metodologia empregada, utilizado aqui, também foi  
10 efetiva para a obtenção de extratos de *H. serratifolius*, visto que o rendimento obtido esteve  
11 próximo ao descrito por ALMEIDA, o que pode ser explicado devido a elevada apolaridade  
12 do solvente.

13 Seguindo a mesma linha de raciocínio, TAVARES e colaboradores (2013) testaram  
14 diversas soluções extrativas para a espécie *Tabebuia impetiginosa* (Ipê roxo, Mart. ex. DC.),  
15 como éter, acetona e água destilada, sendo que quando utilizado o éter alcançaram maior  
16 percentual chegando a 14%. Isso se deve a habilidade dos cristais de lapachol serem  
17 largamente solúveis em solventes menos polares e ligeiramente solúveis em água.

18 Com o intuito de se avaliar a possibilidade de dano morfológico causado pelos  
19 extratos de *H. serratifolius* sobre *C. albicans*, foi realizado estudo de microscopia óptica  
20 (figura 1).

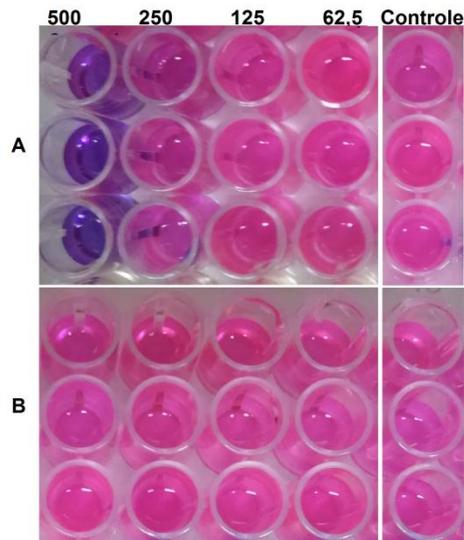


**Figura 1:** Imagem obtida a partir de microscópio óptico do tubo controle negativo (A), tratado com 250 ppm do extrato de caule (B) e 250 ppm do extrato de raiz (C).

Sendo assim, depois de incubados por 7 dias a 37 °C, alíquotas dos tubos controle (sem extrato) e tratado (250 ppm de extrato de caule e 250 ppm de extrato de raiz) foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes, como demonstrado na figura 1. A imagem A, mostra células de *C. albicans* na ausência de extratos vegetais. A figura B, que demonstra células crescidas na presença de extrato de tronco de *H. serratifolius*, observa-se células com morfologia alterada, apresentando-se mais alongadas e com tendência a formar grumos. Já na figura C, que traz o fungo crescido na presença do extrato de raiz, pode-se notar que não houve alteração aparente nas células, permitindo que se conclua que o mesmo não induz dano morfológico às células fúngicas.

As características adquiridas por *C. albicans* na presença do extrato de caule de *H. serratifolius*, são semelhantes às demonstradas na pesquisa de STRINGARO e colaboradores (2014), que ao tratar células fúngicas com óleo essencial de menta, observou que algumas células se mostraram mais inchadas e alongadas, formando também aglomerados. No entanto, resultado semelhante não pôde ser descrito para o extrato de raiz de *H. serratifolius*,

Ainda no sentido de avaliar os efeitos a citotoxicidade dos extratos testados sobre *C. albicans*, foi realizado o teste da microdiluição em placas pelo método resazurin, um importante indicador da atividade mitocondrial de células.



1  
2 **Figura 2:** Atividade mitocondrial de *C. albicans* após exposição à extratos de caule (A) e  
3 raiz (B) de *H. serratifolius*. Células na ausência de extratos de *H. serratifolius* foram usadas  
4 como controle.

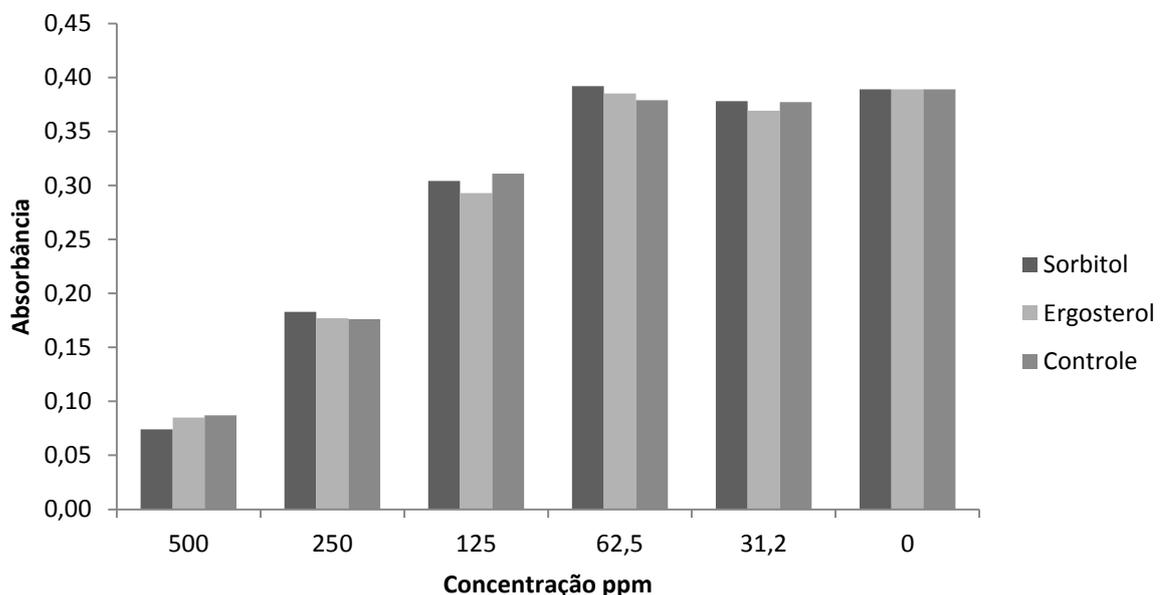
5  
6 Na figura 2 é possível observar que o extrato de caule de *H. serratifolius*, na  
7 concentração de 500 ppm, apresentou efeito inibitório sobre a atividade mitocondrial de *C.*  
8 *albicans* (2A), isso devido à coloração azulada adquirida pelas células nessa concentração.  
9 Nas demais concentrações, nenhum efeito pôde ser observado. Fato semelhante observado na  
10 avaliação do efeito de extrato de raiz sobre a célula fúngica (2B), em que não houve alteração  
11 de cor em nenhuma das concentrações analisadas.

12 Em estudo realizado com protocatecuato de nonila, também utilizou métodos  
13 colorimétricos para avaliação da atividade mitocondrial, observando a atividade antibiofilme  
14 do mesmo contra de *H. capsulatum* e outros fungos via falência mitocondrial, bem como a  
15 atividade do ácido cafeico e alguns de seus derivados, que também foram capazes de inibir o  
16 fungo em sua forma planctônica (ROSINHA, 2013).

17 Utilizando-se o teste do MTT, que se trata de uma abordagem quantitativa da atividade  
18 mitocondrial, foi possível confirmar que, na presença de extrato de caule há uma diminuição  
19 da atividade da mesma, já na presença de 250 ppm, existindo uma redução para 54% da  
20 atividade mitocondrial.

21 Segundo os resultados de SILVA (2012) no teste de MTT, quando a concentração de 1  
22 mg/L de galatos de octila, decila e undecila foram testados, apresentaram baixa na atividade  
23 mitocondrial, variando de 40%, fazendo com que os dados obtidos neste estudo estejam  
24 dentro dos parâmetros descritos na literatura.

1 Com o objetivo de avaliar a interferência dos extratos de tronco e raiz na parede  
 2 celular e membrana plasmática fúngica, foram realizados ensaios de microdiluição em placas,  
 3 para determinação da concentração inibitória mínima desses diferentes extratos na presença  
 4 do sorbitol e do ergosterol. Sorbitol é um protetor osmótico, relacionado à integridade da  
 5 parede e membrana, respectivamente. Placas com *C. albicans*, extratos de *H. serratifolius* e  
 6 sorbitol/ergosterol foram incubadas por 48 horas a 37°C, a fim de calcular a média da  
 7 absorvância a 560 nm e expressa-las em gráficos, como pode-se analisar no gráfico abaixo  
 8 (figura 3).

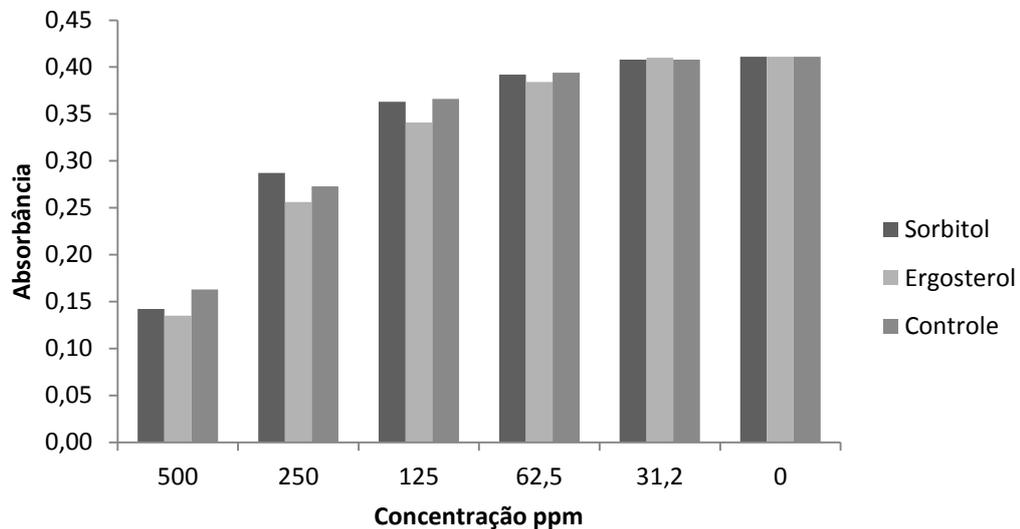


10  
 11 **Figura 3:** Teste da concentração inibitória mínima do extrato de caule de *H. serratifolius* na  
 12 presença de sorbitol e ergosterol, e o controle negativo (ausência de sorbitol e ergosterol).

13  
 14 Na figura 3 pode-se observar que o IC<sub>50</sub> obtido é de 250 ppm para o extrato de caule  
 15 de *H. serratifolius* sobre *C. albicans*, tanto no controle (onde existe apenas o extrato), como  
 16 na presença do ergosterol e do sorbitol. O que nos permite inferir que, o extrato de caule, nas  
 17 concentrações analisadas, não causa dano à membrana plasmática e nem a parede celular. Não  
 18 houve efeito protetor do ergosterol e sorbitol adicionados sobre o fungo.

19 O resultado observado da figura 3, é equivalente ao de EMADI e colaboradores  
 20 (2010), que examinaram o possível mecanismo de ação de binaftoquinonas e concluíram que  
 21 a despolarização da membrana e consequência disto, e não o dano à parede ou constituinte da  
 22 membrana, como esperado. Em ambas as pesquisas não houve alterações na parede celular.

1 Na figura 4, pode-se observar o efeito do extrato de raiz de *H. serratifolius* sobre *C.*  
 2 *albicans* na presença de sorbitol e ergosterol.



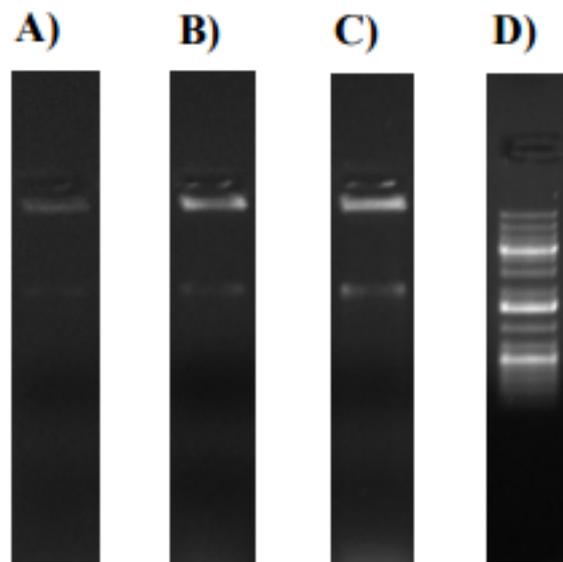
5  
6 **Figura 4:** Teste da concentração inibitória mínima do extrato de raiz de *H. serratifolius* na  
 7 presença de sorbitol e ergosterol, e o controle negativo (ausência de sorbitol e ergosterol).

8  
9 A figura 4, que traz a análise do extrato de raiz de *H. serratifolius*, demonstra  
 10 resultado diferente quando comparado com o extrato de caule da referida planta. De posse dos  
 11 dados apresentados no gráfico, é possível determinar um IC<sub>50</sub> de 500 ppm do extrato de raiz  
 12 na presença do sorbitol, demonstrando o efeito protetor do mesmo sobre o fungo, o que  
 13 permite a conclusão de que este extrato causa dano à parede celular fúngica. Já o IC<sub>50</sub> do  
 14 extrato de raiz e junto ao ergosterol, apresentou um valor de 250 ppm, demonstrando que não  
 15 houve dano à membrana plasmática do fungo.

16 CARMO e colaboradores (2012), analisou o óleo essencial de *Cymbopogon citratus*,  
 17 um produto natural promissor contra *Malassezia* spp., por testes de concentração inibitória  
 18 mínima na presença de sorbitol, ergosterol e o óleo essencial. Puderam concluir, que o óleo  
 19 possui ação direta sobre a membrana plasmática, independente da concentração testada, e  
 20 nenhum efeito sobre a parede celular. Já no artigo de LEITE (2014), que avaliou a atividade  
 21 de citral contra *C. albicans*, pela mesma metodologia, não foi encontrado dano à parede  
 22 celular e nem a membrana, o que demonstra a especificidade do extrato de raiz pela parede  
 23 celular, trata-se de um dado não corriqueiro e importante.

1 No estudo de ALMEIDA e colaboradores (2015), foi encontrada uma CIM no valor de  
2 250 ppm tanto para extrato de caule, quanto para extrato de raiz. Cabe ressaltar que, o  
3 decréscimo desse valor, representado pelo IC<sub>50</sub> de 250 ppm, pode advir das diferenças dos  
4 métodos utilizados, uma vez que aqui, utilizou-se microdiluição seriada, e no estudo de  
5 ALMEIDA, empregou-se a macrodiluição.

6 E buscou-se analisar a possibilidade de dano genotóxico, causado pelos diferentes  
7 extratos de *H. serratifolius* sobre *C. albicans*, a partir da extração do DNA genômico do  
8 fungo após exposição, por 24 horas, aos extratos (figura 5).  
9



10  
11 **Figura 5:** Perfil eletroforético para avaliação do dano ao DNA genômico de *C. albicans* após  
12 exposição à extratos de raiz (A) e tronco (B) de *H. serratifolius*. Em (C) controle sem extratos  
13 e (D) marcador 1Kb thermo scientific.

14 Na figura, pode-se observar que a abundância de material genético na presença do  
15 extrato de raiz (A) foi menor, quando se compara a intensidade das bandas obtidas na  
16 presença do extrato de caule (B) e no controle (C), o que evidencia possível degradação do  
17 DNA, indicando a presença de genotoxicidade por parte do extrato de raiz de *H. serratifolius*  
18 sobre *C. albicans*.

19 Foi demonstrado que extrato de *Pilea microphyla* não apresentou genotoxicidade  
20 contra *Sacharomyces cerevisiae*, e ainda assim, foi considerado um excelente candidato à  
21 antifúngico (MELIM, 2011). Também é sabido que o 5-FC (fluoricitocina), antifúngico de

1 última geração, é uma pirimidina sintética, comprometendo a síntese de DNA (GOODMAN,  
2 GILMAN, 2012). Sendo assim, quanto à genotoxicidade, tanto os resultados obtidos com o  
3 extrato de caule, como aqueles obtidos com o extrato de raiz de *H. serratifolius* permitem que  
4 os mesmo continuem relevantes na busca por novos fármacos.

5

## 6 **CONCLUSÃO**

7 A partir dos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que extratos de caule  
8 e raiz de *H. serratifolius* geram danos citotóxicos e genotóxicos sobre *C. albicans*, dispostos  
9 da seguinte maneira: o extrato de caule causa dano mitocondrial ao fungo, nas concentrações  
10 que variam de 250 à 500 ppm, dependendo da metodologia de avaliação que se utiliza, e  
11 alteração na morfologia celular, promovendo alongamento e formação de grumos, conclusão  
12 obtida a partir de microscópio óptico; o extrato de raiz causa dano a parede celular do fungo,  
13 fato observado a partir do teste de microdiluição seriada e possível dano ao DNA genômico  
14 de *C. albicans*, observado a partir do perfil eletroforético.

15 Sendo assim, a capacidade anti-candida dos extratos de *H. serratifolius*, já  
16 demonstrada por ALMEIDA e colaboradores (2015) foi ratificada, e algumas de suas vias de  
17 ação elucidadas, o que faz com que, na caminhada por novos fármacos, sejam necessários  
18 estudos em busca da toxicidade destes extratos para células humanas, além de testes *in vivo*,  
19 para possível aplicações terapêuticas.

20

## 21 **AGRADECIMENTO**

22 Os autores agradecem a valiosa contribuição das professoras Msc. Amanda Gregorim  
23 Fernandes e Msc. Lívia do Carmo Silva, não só pelo fornecimento de suporte técnico, mas  
24 também pelo apoio à pesquisa e indiscutível massa crítica, indispensáveis na execução deste  
25 trabalho.

26

## 1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2 ABU-AMERO, K. K.; BOSLEY, T. M. Detection of Mitochondrial Respiratory Dysfunction  
3 in Circulation Lymphocytes Using Resazurin. **Arch Pathol Lab. Med.** v. 129, outubro. 2005.

4  
5  
6 ALMEIDA, K.L; SILVA, L.P. Atividade inibitória de *Handroanthus serratifolius*  
7 (OLMSTEAD E GROSE) sobre *Candida albicans*. **Rev. Refacer.** v.4, n. 2. 2015.

8  
9  
10 ALMEIDA, L.F.D. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a amostras clínicas  
11 de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 14, n. 4, p.  
12 649-655. 2012.

13  
14  
15 BARBOSA, T.P.; NETO, H.D. Preparação de derivados do lapachol em meio ácido e em  
16 meio básico: uma proposta de experimentos para a disciplina de química orgânica  
17 experimental. **Rev. Quím. Nova**, v. 36, n. 2, p. 331-34, fevereiro. 2013.

18  
19  
20 BETONI, J.E.C. *et al.* Synergism Between Plant Extract and Antimicrobial Drugs Used on  
21 *Staphylococcus aureus* diseases. **Rev. Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 387-390, 2006.

22  
23  
24 CAMARGO, F.P. *et al.* Isolamento de *Candida sp.* da mucosa vaginal de mulheres atendidas  
25 em um serviço de ginecologia do Município de Santo Ângelo – RS. **Rev. Newslab.** v. 87, n.  
26 1. 2008.

27  
28  
29 CARMO, E.S. *et al.* Essential oil from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: a promising natural  
30 product against *Malassezia spp.* **Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo**, v. 71, n. 2, p. 386-91.  
31 2012.

32  
33  
34 CHAFFIN, W.L. *et al.* Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification,  
35 function, and expression. **Rev. Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v. 62, n. 1, p.  
36 130-180. 1998.

37  
38  
39 COSTA, A.M. **Estudo do mecanismo de ação citotóxica de naftoquinonas sintéticas**  
40 **análogas do lapachol.** 2012. 77 f. Dissertação (Pós-graduação em farmacologia).  
41 Universidade Federal do Ceará, Faculdade de medicina. Fortaleza.

42  
43  
44 COSTA, C.R. **Fatores de virulência de isolados de *Candida* de pacientes**  
45 **imunocomprometidos. Caracterização molecular de *Candida albicans* suscetíveis e**  
46 **resistentes ao fluconazol.** 2009. 77 f. Dissertação (Tese de Doutorado em medicina tropical e  
47 saúde pública). Universidade Federal de Goiás. Goiânia.

48  
49

- 1 DEMITTO, F.O. *et al.* Suscetibilidade a antifúngicos *in vitro* de *Candida spp.* em pacientes  
2 do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **Rev. J Bras Patol Med Lab.** v. 48, n. 5,  
3 p. 315-321, outubro 2012.  
4  
5
- 6 EMADI, A. Chemical genetic screen for modulators of asymmetrical 2, 2'-dimeric  
7 naphthoquinones cytotoxicity in yeast. **Rev. PloS one**, v. 5, n. 5 , 2010.  
8  
9
- 10 FROST, D. J. *et al.* “A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors  
11 towards fungal cell wall synthesis and assembly,” **Rev. Journal of Antibiotics**, vol. 48, no. 4,  
12 pp. 306–310, 1995.  
13  
14
- 15 GOODMAN, L. S; GILMAN, A. **As bases Farmacológicas da terapêutica 12° ed.** Porto  
16 Alegre. Mc Graw Hill. p. 2112, 2012.  
17  
18
- 19 KARKOWSKA-KULETA, J. *et al.* Fungi pathogenic to humans: molecular bases of  
20 virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Rev.**  
21 **Acta. Biochimica. Polonica.** v. 56, n. 2, p. 211-224. 2009.  
22  
23
- 24 KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The yeasts. **Rev. A taxonomic study.** 4. ed. Amsterdam:  
25 Elsevier, 1998.  
26  
27
- 28 LEITE, M. C. A. *et al.* Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of Citral  
29 against *Candida albicans*. **Rev. Evidence-Based Complementary and Alternative**  
30 **Medicine**, v. 14, p. 1-9, agosto, 2014.  
31  
32
- 33 LIMA, A.P. *et al.* Cytotoxicity and Apoptotic Mechanism of Ruthenium(II) Amino Acid  
34 Complexes in Sarcoma-180 Tumor Cells. **Rev. PLOS ONE**, Estados Unidos, v. 9, n. 10, p.  
35 1-11, outubro, 2014.  
36  
37
- 38 LUNDE, C. S.; Kubo, I. “Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of  
39 *Saccharomyces cerevisiae*,” **Rev. Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p.  
40 1943–1953, 2000.  
41  
42
- 43 MARDEGAN, R.C. *et al.* Biotyping and genotypic diversity among oral *Candida albicans*  
44 strains from caries-free and caries-active healthy children. **Rev. Brazilian Journal of**  
45 **Microbiology.** v. 37, n.1, p. 26-32, 2006.  
46  
47
- 48 MELIM, C. **Avaliação do potencial antimicrobiano de quatro espécies de plantas**  
49 **medicinais da flora brasileira.** 2011. 89 f. Dissertação (Programa de Mestrado em Ciências  
50 Farmacêuticas) Universidade do Vale de Itajaí.

1  
2  
3 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to  
4 proliferation and cyto-toxicity assays. **Rev. J. Immunol. Methods.**, v. 16;65, n. 1-2, p. 55-  
5 63, dez., 1983.

6  
7  
8 NETO, M.M. *et al.* Candidíase em pacientes transplantados renais. **Rev. Soc. Bras. Med.**  
9 **Trop.** v. 30, n. 6, p. 485-491, nov./dez. 1997.

10  
11  
12 OLIVEIRA, R.D.R. *et al.* Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. .  
13 **Rev. Ass. Med. Bras.** v. 47, n. 3, p. 231-235. 2001.

14  
15  
16 OLMSTEAD, R.G.; GROSE, S.O. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuias*.  
17 l. (Bignonoaceae). **Rev. Systematic Botany.**, v. 32, n. 3, p. 660-670, 2007.

18  
19  
20 PEDROSO, L.A. **Estudos dos aspectos clínicos da gardnerella vaginalis e candidíase**  
21 **vaginal**. 2009. 45 f. Dissertação (Pós-graduação em ciências farmacêuticas). Universidade do  
22 Extremo Sul Catarinense- UNESC. Criciúma.

23  
24  
25 ROSINHA, M.Y. **Desenvolvimento de protótipos antifúngicos contra biofilmes de**  
26 **Histoplasma capsulatum**. 2013. 58 f. Dissertação (Graduação em Farmácia-Bioquímica).  
27 Universidade Estadual Paulista.

28  
29  
30 SANDHU, G.S.; KLINE, B.C.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G.D. Molecular probes for  
31 diagnosis of fungal infections. **Rev. J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 11, p. 2913-2919, nov.,  
32 1995.

33  
34  
35 SILVA, A.A.P. **Avaliação por métodos fenotípicos e proteômicos de galatos de alquila**  
36 **com atividade anti – complexo *Paracoccidioides***. 2012. 108 f. Dissertação (Pós-graduação  
37 em Biotecnologia Aplicadas à Farmácia). Universidade Estadual Paulista.

38  
39  
40 SILVA, H.M. **Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em**  
41 **pacientes transplantados de medula óssea**. 2011. 67 f. Dissertação (Pós-graduação em  
42 medicina tropical e saúde pública). Universidade Federal de Goiás. Goiânia.

43  
44  
45 STRINGARO, A. *et al.* Effects of *Mentha suaveolens* Essential Oil Alone or in Combination  
46 with Other Drugs in *Candida albicans*. **Rev. Evidence-Based Complementary and**  
47 **Alternative Medicine**. v. 14 p. 1-9, fevereiro. 2014.

48  
49

- 1 TAMURA, N.K. *et al* . Fatores de virulência de *Candida spp* isoladas de cateteres venosos e  
2 mãos de servidores hospitalares. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 40, n. 1, p. 91-  
3 93, fevereiro. 2007.  
4  
5  
6 TAVARES, S.R.C. *et al*. Influência da polaridade do solvente na extração de lapachol bruto.  
7 **Rev. Biochemistry and Biotechnology Reports.**, v. 2, n. 2, p. 79-81, 2013.  
8  
9  
10 WIGGERS, I; STANGE, C.E.B.; **Manual de instruções para coleta, identificação e**  
11 **herborização de material botânico.** Programa de Desenvolvimento Educacional – SEED.  
12 Laranjeiras do Sul, 2008.  
13  
14  
15 ZHANG, H. X. *et al*. Assay of mitochondrial functions by resazurin *in vitro*. **Acta**  
16 **Pharmacol Sin.**, v. 25, n. 3, p. 385-389, 2004.