

Universidade Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA

Curso de Medicina

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

André Lucas Seixas Macalão

Edson José Pereira Junior

João Manoel Palmeira Ferrato Gomes

Mikaela Aires Martins Ribeiro

Paola Souza Manzi

Thalita Lisboa Cunha

Anápolis - Goiás

2021

Universidade Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA

Curso de Medicina

**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 Lívia do Carmo Silva.

Anápolis - Goiás

2021

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

À

Coordenação de Iniciação Científica

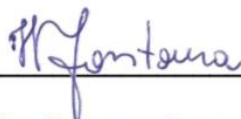
Faculdade da Medicina – UniEvangélica

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 spp. são fungos diploides e polimórficos, encontrados em diversos ecossistemas, que fazem parte da microbiota normal de homens e de animais. Essas leveduras podem se tornar patogênicas devido a um desequilíbrio na relação micro-organismo/hospedeiro. 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 e são potenciais matérias-primas para a aquisição de novos fármacos. Dessa maneira, evidenciam-se as potenciais propriedades terapêuticas da *Croton urucurana*, popularmente conhecida como “Sangra d’água”, que apresenta diversas aplicações medicinais devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, cicatrizadores, antidiarreicos, antimicrobianos e antifúngicos. Diante desse contexto, o presente trabalho tem como objetivo identificar o tipo de ação gerada por *C. urucurana* em *C. albicans* e analisar a atividade citotóxica da planta em células humanas normais. Para isso, foi realizado um estudo de caráter experimental, de abordagem indutiva, no qual se obteve o extrato hidroalcolico de *C. urucurana*, com rendimento no valor de 5,2%. Constatou-se que o extrato inibe o crescimento de células leveduriformes de *C. albicans* de modo dose-dependente, apresentando efeitos danosos à atividade mitocondrial fúngica e à parede celular, não apresentando efeitos deletérios sobre a membrana celular. Além disso, nas mesmas concentrações testadas, apresenta-se citotóxica às células humanas. Destarte, conclui-se que *C. urucurana* apresenta atividade antifúngica ao exercer efeitos sobre a parede celular e mitocôndrias fúngicas, no entanto, na mesma concentração, apresenta-se citotóxica às células humanas.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Candidíase. *Croton urucurana*. Fitoterapia.

ABSTRACT

Candida spp. is a species of polymorphic diploid fungi found in many ecosystems, including the human physiological microbiota. These yeasts can become pathogenic once there's an imbalance in the commensalism. Natural derivatives, either from animal, mineral or vegetable sources have been widely used in the treatment of all sorts of diseases throughout Human History and currently remain as a potential feedstock to the development of new drugs. Thereby, the ambitious therapeutic actions of *Croton urucurana*, popularly known in Brazil as 'Sangra d'água', involving health-giving assets that goes among anti-inflammatory, analgesic, healing, and antifungal effects, reveal itself relevant. Wherefore, the current project aims to identify the action tool of *C. urucurana* and its outcomes on *C. albicans* as well as to analyze its cytotoxic activity in human cells. Therefore, an experimental study was carried out, with an inductive approach, in which the hydroalcoholic extract of *C. urucurana* was obtained with an income of 5,2%. It was found that the extract inhibits the growth of yeast cells of *C. albicans* in a dose-dependent manner, with harmful effects on the fungal mitochondrial activity and on the cell's wall but no deleterious effects on the cell membrane was verified. Furthermore, with the same tested concentrations, it is established its human cells cytotoxicity. Thus, it was figured that *C. urucurana* has antifungal activity by exerting effects on the cell's wall and fungal mitochondria. Nevertheless, with the same concentration, it is cytotoxic to human cells.

Key words: *Candida albicans*. Candidiasis. *Croton urucurana*. Herbal Medicine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 <i>Candida albicans</i>	10
2.2 Candidíase	11
2.3 Tratamento tradicional para candidíase	12
2.4 Produtos naturais como candidatos a novos fármacos	14
2.5 Croton urucurana	15
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. METODOLOGIA	18
4.1 Tipo do estudo	18
4.2 Local do estudo	18
4.3 Coleta do material vegetal	18
4.4 Obtenção do extrato hidroalcoólico de <i>C. urucurana</i>	19
4.5 Cultivo e manutenção do fungo <i>C. albicans</i>	20
4.6 Determinação da concentração inibitória mínima em microplaca (CIM)	20
4.7 Avaliação de danos na parede celular de <i>C. albicans</i> causado por <i>C. urucurana</i>	20
4.8 Avaliação do dano à membrana plasmática causado por <i>C. urucurana</i> em <i>C. albi-</i> <i>cans</i>	21
4.9 Avaliação do dano mitocondrial causado por <i>C. urucurana</i> em <i>C. albicans</i>	21
4.10 Avaliação do dano às células humanas causado por <i>C. urucurana</i>	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Rendimento do extrato de <i>C. urucurana</i>	23
5.2 Avaliação dos danos causados por <i>C. urucurana</i> em <i>C. albicans</i>	23
5.3 Avaliação da citotoxicidade do <i>C. urucurana</i> em <i>C. albicans</i>	24
5.4 Índice de seletividade de <i>C. urucurana</i>	25
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÃO	31
8. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

Candida spp. são fungos diploides e polimórficos, encontrados em diversos ecossistemas, fazendo parte da microbiota de homens e animais. Estima-se que cerca de 25 a 75% dos indivíduos saudáveis apresentam *Candida* spp., micro-organismo que estabelece uma relação de comensalismo com o hospedeiro, habitando, primariamente, o trato gastrointestinal, a microbiota vaginal, a uretra e os pulmões (ALONSO-VALLE *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2004; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Essas leveduras podem se tornar patogênicas oportunistas devido a um desequilíbrio na relação micro-organismo/hospedeiro, em razão do comprometimento do sistema imune ou rompimento das barreiras anatômicas. Dessa forma, são responsáveis por 80% dos casos de infecções fúngicas sistêmicas e são a quarta causa mais comum de infecções sistêmicas adquiridas em hospitais nos Estados Unidos, com taxas de mortalidade de 50% (ABI-SAID *et al.*, 1997; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; PFALLER; DIEKEMA, 2010).

Tendo em vista o potencial deletério da Candidíase, tem-se quatro subformas de relevância epidemiológica no contexto brasileiro: candidíase vulvovaginal, candidíase oral, candidíase esofágica e candidíase sistêmica. Em todas essas formas, quando há um quadro de diminuição da imunidade e ambiente propício à superpopulação fúngica, ocorre invasão epitelial, secreção de fatores de virulência, inflamação e consequente infecção de diversas regiões susceptíveis a esses fungos (PAPPAS *et al.*, 2016; REVANKAR, 2017; LI *et al.*, 2019; VILA *et al.*, 2020; WILLEMS *et al.*, 2020).

Diante disso, o quadro clínico dessas infecções é bastante variado, podendo manifestar-se de forma assintomática ou com presença de sintomas longamente conhecidos pela população, como corrimento esbranquiçado, prurido intenso, acometimento parcial ou total de mucosas, erupção cutânea e comprometimento ocular. Geralmente, os diagnósticos são feitos com o exame físico e o manejo de culturas em que há identificação de *C. albicans* (PAPPAS *et al.*, 2016; REVANKAR, 2017; LI *et al.*, 2019; VILA *et al.*, 2020; WILLEMS *et al.*, 2020).

A primeira opção para tratamento convencional de candidíase vulvovaginal é miconazol ou nistatina em creme vaginal e, como segunda opção de medicamento, tem-se o fluconazol e itraconazol, via oral (BRASIL, 2020). Para a infecção oral pelo fungo, recomenda-se nistatina em uso tópico como primeira escolha e cetoconazol ou fluconazol como segunda. Já para

candidíase esofágica, a conduta terapêutica é cetoconazol via oral e, alternativamente, fluconazol ou anfotericina B pela mesma via de administração (BRASIL, 2002). 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 (LATADO *et al.*, 2012; PAPPAS *et al.*, 2016).

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. Os estudos farmacológicos envolvendo os derivados de plantas foram base para a produção dos primeiros fármacos, como aspirina, digitoxina e morfina e hoje, aliados aos avanços da engenharia genética e tecnologia, são potenciais matérias-primas para novos fármacos que devem atender a novas demandas (BUTLER, 2004; LAHLOU, 2013).

Os fármacos derivados de plantas, além de terem sido utilizados em larga escala para o tratamento de várias doenças, possuem um grande índice de aceitação popular e confiabilidade para o seu uso. Segundo a OMS, em 1980, 80% da população mundial confiava no uso desses produtos para o tratamento. Além da boa aceitação e uso disseminado, esses fármacos ainda possuem um alto potencial para combater fungos, que têm se tornado cada vez mais resistentes aos tratamentos convencionais. Os compostos têm atividade microbicida feita por diversos mecanismos de ação, constituindo uma ampla variedade de fontes para a obtenção de novos fármacos e uma promissora alternativa para o tratamento de doenças causadas por esses micro-organismos, em especial *C. albicans* (FARNSWORTH, 1985; SARDI *et al.*, 2013).

Croton urucuruna, popularmente conhecida como “Sangra d’água”, é uma árvore da família das euforbiáceas encontrada principalmente no Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (CÂNDIDO-BACANI *et al.*, 2015). O possível efeito medicinal dessa planta vem da sua utilização por tribos indígenas para o tratamento de feridas infectadas, no entanto, nos últimos anos, ela passou a ser aplicada em diversas situações (SIMIONATTO *et al.*, 2007).

Diante dessa nova perspectiva, a planta vem apresentando várias aplicações medicinais devido aos seus efeitos anti-inflamatório, analgésico, cicatrizante, antidiarreico, antimicrobiano, antifúngico e às suas propriedades para tratar gastrite, úlceras, dor nas costas e até mesmo câncer (CORDEIRO *et al.*, 2016; LEITE *et al.*, 2017). No entanto, faz-se

necessário mais estudos para explicar o mecanismo de ação pelo qual a *C. urucuruna* exerce seus efeitos (CORDEIRO *et al.*, 2016).

É importante destacar que o tratamento prolongado das micoses superficiais sistêmicas, associado à alta toxicidade dos medicamentos disponíveis e ao aparecimento de isolados multirresistentes, têm levado à necessidade de desenvolvimento de novos fármacos. Nesse cenário, inúmeras plantas são utilizadas pela população para o tratamento de doenças, dentre elas, aquelas causadas por fungos, porém a eficácia terapêutica desses extratos tem sido pouco estudada. Logo, torna-se extremamente relevante a busca de compostos provenientes dessas plantas que atuem como inibidores para micror-organismos como a *C. albicans*. Dessa forma, como já foi mostrado atividade antifúngica da *C. urucuruna*, percebe-se a relevância em avaliar o tipo de dano causado por ela para determinar sua viabilidade no tratamento de infecções por *C. albicans*.

Diante disso, o objetivo deste trabalho é identificar o tipo de ação gerada por *C. urucuruna* em *C. albicans* e analisar a atividade citotóxica da planta em células humanas normais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Candida albicans*

Candida spp. são classificadas taxonomicamente no reino Fungi, pela divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae*, sendo o principal gênero entre as leveduras patogênicas, compreendendo cerca de 200 espécies (SIDRIM; ROCHA, 2004; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Esses fungos são diploides e polimórficos e são encontrados em diversos ecossistemas, fazendo parte da microbiota de homens e animais e estima-se que 25 a 75% dos indivíduos saudáveis apresentam *Candida* spp. São micro-organismos que exibem uma relação de comensalismo com o hospedeiro e habitam primariamente o trato gastrointestinal, microbiota vaginal, uretra e pulmões (ALONSO-VALLE *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2004; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Essas leveduras podem se tornar patogênicas devido a um desequilíbrio na relação micro-organismo/hospedeiro, tal como o comprometimento do sistema imune ou rompimento das barreiras anatômicas; sendo, portanto, consideradas oportunistas. Dessa forma, são responsáveis por 80% dos casos de infecções fúngicas sistêmicas e são a quarta causa mais comum de infecções sistêmicas adquiridas em Hospitais nos Estados Unidos, com taxas de mortalidade de 50% (ABI-SAID *et al.*, 1997; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; PFALLER; DIEKEMA, 2010).

A capacidade da *C. albicans* infectar o hospedeiro é consequência de diversos fatores de virulência, exemplificados pelo polimorfismo, expressão de moléculas de adesão, troca fenotípica, secreção de enzimas hidrolíticas e pela formação de biofilme (NICHOLLS *et al.*, 2011). Dentre os fatores do hospedeiro relacionados às infecções fúngicas, evidenciam-se uso de antibióticos de largo espectro, tempo prolongado de internação hospitalar, neutropenia, nutrição parental, sonda vesical, ventilação mecânica, cateter venoso central e colonização de sítios anatômicos por leveduras (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Em relação aos fatores de virulência, é possível evidenciar o intenso polimorfismo celular ou dimorfismo, sendo caracterizado como a capacidade da levedura em alterar sua morfologia dependendo das condições de temperatura e do pH, podendo apresentar-se sob a forma arredondada, denominada blastoconídio, formando pseudo-hifas, hifas ou micélios

verdadeiros, sendo que cada uma dessas formas contribui para a virulência de *C. albicans* no hospedeiro (KUMAMOTO; VINCES, 2005; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

C. albicans possui um conjunto especializado de proteínas, denominadas de adesinas, que são capazes de mediar a adesão a outros micro-organismos, superfícies abióticas e células hospedeiras (RANE *et al.*, 2013). Assim sendo, esta levedura pode aderir à superfície de dispositivos, como o cateter e formar biofilmes, facilitando as infecções pela corrente sanguínea, além de ser um importante fator de resistência à terapêutica convencional. Além disso, a virulência é atribuída à produção de proteinases e fosfolipases, em que a atividade da primeira está diretamente relacionada com uma família de isoenzimas proteinase aspartil secretora (SAP), em virtude da expressão desses genes estar associada a infecções invasivas, devido à formação de pseudomicélio, aderência e variabilidade fenotípica (MAYER *et al.*, 2013).

2.2 Candidíase

C. albicans é um membro da microbiota humana, cuja colonização é, geralmente, assintomática. Contudo, em situações de vulnerabilidade imunológica ou oportunismo micro ambiental, condições patológicas de proliferação desse fungo, chamadas candidíases, instalam-se e causam agravos ao ser humano. As quatro subformas mais prevalentes de candidíase encontradas em seres humanos são a vulvovaginal, a oral, a esofágica e a sistêmica. Nesse sentido, infecções sintomáticas da mucosa do trato reprodutor feminino inferior resultam, primariamente, de uma superpopulação fúngica da vagina e subsequente invasão epitelial e produção de fatores de virulência. Frequentemente, isso é acompanhado de um corrimento vaginal com escape de epitélio, células imunes e fluido mucoso, além de sintomas como prurido, pirose, rubor e dor. Em contraste com a candidíase oral, a candidíase vulvovaginal (CVV) acomete mais frequentemente mulheres imunocompetentes e saudáveis, fato comprovado pela incidência de aproximadamente 75% de todas as mulheres, em pelo menos algum estágio de sua vida (WILLEMS *et al.*, 2020).

Em relação ao manejo dessa condição vulvovaginal, as diferenças entre as microbiotas individuais são fundamentais para se estabelecer o risco de evolução para um quadro patológico, o seu diagnóstico e o seu tratamento. Mulheres com suspeita de CVV, devem ser avaliados segundo exames microscópicos de esporos, hifas e blastóporos. Entre as principais alternativas ao tratamento medicamentoso clássico (azóis e drogas de polieno), tem-se a

redução do agente infeccioso, restauro do equilíbrio fisiológico da microbiota, promoção de repovoamento de lactobacilos e reestabelecimento do pH ácido considerado “normal”. Tem sido relatado, ainda, que a CVV ou CVV recorrente associa-se frequentemente a uma resposta imunopatogênica, em que o estímulo à resposta de defesa do hospedeiro por meio de estratégias terapêuticas contra infecções por *Candida* pode ser responsável pela redução da colonização fúngica (LI *et al.*, 2019).

Novamente, *C. albicans* é o principal agente causador da Candidíase Oral (CO), sendo responsável por 95% da incidência desses casos. Apesar de ocasionalmente patogênico, esse fungo é um comensal onipresente da microbiota da mucosa oral facilmente isolado das cavidades orais de indivíduos saudáveis. Durante seu processo natural de fermentação, *C. albicans* adere-se reversivelmente ao epitélio da mucosa oral por meio de interações eletrostáticas, mediadas por glicoproteínas. Logo aderido, exibe a capacidade de mutar-se morfológicamente no padrão filamentosos que facilita sua penetração epitelial. Nesse sentido, suas principais manifestações são placas multifacetadas amarelo-esbranquiçadas distribuídas em toda a mucosa oral (manifestação aguda da CO), lesões avermelhadas dolorosas por toda a cavidade oral (candidíase eritematosa aguda) e estomatite dentária, caracterizada por um eritema da mucosa palatina portadora de prótese (candidíase eritematosa/atrófica crônica) (VILA *et al.*, 2020).

Tem-se ainda a forma de Candidíase Esofágica, infecção oportunista muito presente em pacientes com AIDS. É a forma mais comum de esofagite contagiosa. Geralmente, manifesta-se de forma assintomática, porém, entre os sintomas relatados mais comuns tem-se disfagia, odinofagia e dor retroesternal. Pode ainda ser acompanhada de dor abdominal, pirose, perda ponderal, diarreia, náuseas, êmese e melena. Em sua forma mais grave, pode evoluir para ulcerações esofágicas com perfuração ou sangramento, desnutrição, sepse, candidemia, estenose esofágica e formação de fístula em uma árvore brônquica. Seu diagnóstico é feito por meio de endoscopia, com a confirmação através da visualização de placas brancas ou exsudato. Para confirmação histológica da infecção, pode-se realizar biópsia ou escovação das placas (ROBERTSON, 2020).

Além dessas três formas de candidíase, uma quarta forma com relevância epidemiológica persiste entre os agravos de saúde da população brasileira: a candidíase invasiva. Essa divide-se em candidíase invasiva e candidemia, sua forma mais comum. Na candidíase invasiva, a infecção se dissemina para outras partes do corpo, como válvulas

cardíacas, cérebro, baço, rins e olhos. Ocorre principalmente em indivíduos com comprometimento do sistema imunológico e em pacientes hospitalizados. Já a candidemia é uma infecção séria da corrente sanguínea, tendo seu risco aumentado em: cirurgia de grande porte, uso de cateteres ou tubos intravenosos, sobretudo, tubo inserido em uma das vias grandes do pescoço, região superior do tórax ou na virilha (cateter venoso central) ou sonda nasogástrica de fornecimento nutricional, além do risco de infecção com o uso de determinados antibióticos (REVANKAR, 2017).

A sintomatologia da candidemia é inespecífica, todavia, as queixas mais recorrentes são: febre, calafrios e outros sinais de reação inflamatória que não desaparecem ou melhoram após antibioticoterapia. Em caso de disseminação da infecção para outros órgãos, os sintomas têm apresentação clínica consoante com o local infectado, podendo evoluir, inclusive, para falência múltipla de órgãos. Ademais, o diagnóstico é baseado na verificação de testes microbiológicos, exame direto, histopatologia, cultura de locais estéreis ou testes sorológicos para anticorpos e antígenos e testes moleculares para detectar o DNA de *Candida spp.*. Foi observado que a candidemia tem risco de mortalidade elevado se o tratamento for iniciado tardiamente, sendo um evento terminal em uma proporção significativa de pacientes. Por outro lado, o principal fator de melhora do prognóstico é o tratamento antifúngico precoce (CORTÉS, 2020).

2.3 Tratamento tradicional para candidíase

Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), do Ministério da Saúde, de 2020, as primeiras opções de tratamento para a candidíase vulvovaginal são miconazol ou nistatina em uso tópico, sob a forma de creme vaginal. Tem-se como segundas opções o fluconazol, em dose única, ou itraconazol, ambos por via oral. O tratamento oral está contraindicado na gestação e na lactação. Sendo assim, durante a gravidez, o tratamento deve ser realizado somente por via vaginal. A conduta terapêutica para casos recorrentes é a mesma, apenas se prolongando os dias de tratamento, além da opção de óvulos vaginais. Vale ressaltar que as parcerias sexuais não precisam ser tratadas, exceto as sintomáticas.

O tratamento para candidíase oral, em consonância com o caderno de atenção básica número 9, Dermatologia na Atenção Básica de Saúde, do Ministério de Saúde, de 2002, consiste em nistatina de uso tópico e, para crianças, utiliza-se a suspensão oral. Como

tratamento de 2ª escolha ou em pacientes imunocomprometidos, pode ser utilizado o cetoconazol ou fluconazol, via oral, devendo ser evitado seu uso em crianças. De acordo com o mesmo documento, para o seguimento terapêutico de candidíase esofágica recomenda-se cetoconazol, via oral, como medicamento de primeira escolha e fluconazol ou anfotericina B como opções de segunda escolha.

O esquema terapêutico para pacientes críticos ou gravemente enfermos por candidíase sistêmica constitui-se de equinocandina (caspofungina, micafungina ou anidulafungina); fluconazol é indicado para pacientes clinicamente estáveis; e, alternativamente, voriconazol ou anfotericina B, caso haja intolerância, disponibilidade limitada ou resistência a outros antifúngicos. Além disso, em pacientes com candidíase invasiva, condições predisponentes, como neutropenia, imunossupressão, uso de antibacterianos de amplo espectro, hiperalimentação e cateteres intravenosos, devem ser revertidas ou, se possível, controladas. O tratamento da candidemia é mantido por 14 dias após a última hemocultura negativa (LATADO *et al.*, 2012; PAPPAS *et al.*, 2016).

2.4 Produtos naturais como candidatos a novos fármacos

O uso de produtos naturais, sejam eles de origem animal, vegetal ou até mesmo mineral para se tratar das doenças humanas é uma prática muito antiga e considerada como pioneira na ação medicinal. A grande maioria das drogas existentes se originaram de produtos naturais ou de compostos derivados de produtos naturais. Até o final do século XIX, os únicos medicamentos disponíveis para tratamento de doenças animais e humanas eram os extratos brutos e semi-puros de plantas, micro-organismos, animais e minerais. Atualmente, nos países industrializados, cerca de 50% dos medicamentos prescritos são derivados ou sintetizados de produtos naturais (LAHLOU, 2013).

Os estudos clínicos, farmacológicos e químicos envolvendo esses produtos naturais, principalmente derivados de plantas, foram a base para a produção dos primeiros fármacos, como aspirina, digitoxina, morfina, quinina e pilocarpina. Além disso, mesmo com o advento do avanço tecnológico e dos novos métodos alternativos para a produção de fármacos, os produtos naturais continuam sendo uma fonte de alta variedade e significância para doenças que são mais frequentes no século XXI, como hipertensão, câncer, imunossupressão e doenças neurológicas (BUTLER, 2004; LAHLOU, 2013).

Outro potencial dos produtos naturais extremamente relevante para o futuro da medicina se encontra na capacidade de resolver, a curto prazo, os problemas relativos à resistência bacteriana. A grande variedade dos produtos naturais, aliada aos métodos de engenharia genética se mostraram eficazes no combate às bactérias que se mostram resistentes aos antibióticos mais prescritos e consolidados no mercado (ROSSITER, 2017).

As plantas, em especial, são uma classe de produtos naturais que se revelam mais conhecidas e muito usadas atualmente como fármacos para as mais diversas condições, patológicas ou não, ou preventivas, seja cientificamente comprovada ou não a sua eficácia. A disseminação do seu uso para fins de saúde se revela como altamente importante. Em 1985, segundo a Organização Mundial da Saúde, até 80% da população mundial confiava nos medicamentos tradicionais para a terapia, sabendo que seus compostos eram previamente extraídos principalmente de plantas (FARNSWORTH *et al.*, 1985).

O uso dos medicamentos fitoterápicos na terapêutica é sem dúvida uma prática essencial e muito bem-sucedida na medicina. O sucesso desses produtos no tratamento se deve a suas propriedades químicas aliadas às novas práticas de biologia celular e molecular e engenharia genética, que permitiram a otimização dos processos de produção e obtenção dos princípios ativos desses compostos, assim como a maximização de sua atividade biológica. (LAHLOU, 2013).

A atividade antifúngica dos produtos naturais, principalmente os derivados de plantas, tem se mostrado um fator promissor para o combate às crescentes infecções provenientes desses micro-organismos. Dois principais motivos explicam essa nova tendência, sendo eles o desenvolvimento de resistência dos patógenos aos fármacos e a toxicidade dos antifúngicos já usados em humanos. Em relação à *C. albicans*, os produtos naturais derivados de plantas possuem diversos mecanismos de ação microbicida, baixo custo comercial e uma ampla variedade potencial a ser explorada para o combate a essa espécie de fungo e às novas formas resistentes, que a cada vez mais requerem tratamentos alternativos (SARDI *et al.*, 2013)

2.5 *Croton urucurana*

Croton urucuruna, popularmente conhecida como “Sangra d’água”, é uma espécie de árvore encontrada em florestas ribeirinhas, principalmente no Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina. Essa espécie é da família das euforbiáceas, a qual representa uma das principais e

mais complexas da flora brasileira (PERES *et al.*, 1998). O gênero *Croton* representa um dos maiores, o segundo da família, englobando cerca de 1300 espécies, incluindo ervas, arbustos e árvores distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (CÂNDIDO-BACANI *et al.*, 2015).

O seu nome popular (“sangra d’água”, “sangue de dragão”) vem do fato de que quando cortados, o caule da *C. urucurana* e outras espécies do gênero do *Croton* liberam uma seiva vermelho sangue (CÂNDIDO-BACANI *et al.*, 2015). Diversas espécies desse grupo, incluindo a *C. urucurana*, são amplamente utilizadas por tribos indígenas da Amazônia para o tratamento de feridas infectadas e para a acelerar o processo de cura (SIMIONATTO *et al.*, 2007).

Considerando esse possível efeito medicinal da Sangra d’água, admite-se que seu uso como remédio vai além das tribos indígenas. Atualmente, a planta apresenta diversas aplicações na medicina popular, diante dos seus possíveis efeitos anti-inflamatório, analgésico, cicatrizador, antidiarreico e propriedades para tratar gastrite, úlceras, dor nas costas e até mesmo câncer (CORDEIRO *et al.*, 2016). Três diferentes produtos dessa planta são usados como remédio: a seiva vermelha, a casca do caule e a goma exsudativa (SIMIONATTO *et al.*, 2007).

No estudo de Peres e colaboradores (1997), foi obtido o extrato da *C. urucurana*, e, a partir da análise deste, foram identificados diversos produtos que comprovavam os efeitos analgésicos e anti-inflamatório, tais como campesterol, estigmasterol, bsitosterol, ácido acetil-aleurítico, catequina, galocatequina e β -sitosterol-glucosídeo. No entanto, na mesma pesquisa, é exposto que esses compostos não são capazes de explicar por completo a atividade medicinal da Sangra d’água.

Além disso, diversos estudos mostram que algumas espécies do gênero *Croton* possuem considerável atividade antimicrobiana e antifúngica, associado a uma relativa modulação da ação de antimicrobicidas e antifúngicos (LEITE *et al.*, 2017). Essa atividade microbicida da Sangra d’água é bem relatada, apresentando efeito contra *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus aureus*, *Escheria coli*, *Salmonella typhimurim* (PERES *et al.*, 1997). No entanto, ainda são necessários mais estudos que corroborem melhor essa possível utilização da *Croton urucurana* na medicina popular. (CORDEIRO *et al.*, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 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.

3.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato hidroalcoólico 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*.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo do estudo

Foi realizado um estudo de caráter experimental, de abordagem indutiva, com procedimento comparativo estatístico e técnica de documentação direta em laboratório.

4.2 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.

4.3 Coleta do material vegetal

As amostras da *C. urucurana* foram coletadas no Bairro Anápolis City, na cidade de Anápolis-GO, nas coordenadas geográficas (-16.3265518, - 48.9349331). Foram utilizados para a coleta os seguintes materiais: facão, fita métrica, jornal e álcool 70%. 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 do facão. A porção do tronco de interesse da pesquisa é facilmente identificada através da resina de coloração vermelho vivo, sendo um sinal característico de *C. urucurana*, bem descrito na literatura e representado na Figura 1.



Figura 1. Seiva avermelhada da *C. urucurana*.
Fonte: os autores.

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 permaneceu por um total de 4 dias, de maneira que as folhas de jornal fossem trocadas diariamente, visando uma aceleração do mesmo.

4.4 Obtenção do extrato hidroalcoólico de *C. urucurana*

A obtenção do extrato de *C. urucurana* seguiu o preconizado por Moraes e colaboradores (2010) com modificações, por se tratar de espécies diferentes de plantas, mas equivalentes quanto à marcha analítica. Após as lascas de entrecasca secarem naturalmente, elas 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, com o auxílio de um funil, 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.

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 mais 24 horas. Além disso, houve a transferência da amostra armazenada no béquer para o balão volumétrico por meio de um funil. A seguir, o balão foi colocado no rotaevaporador a 80 rotações por minuto e a 40 °C, para que todo o solvente fosse retirado, como elucidado na figura 2 (PACHECO *et al.*, 2015).

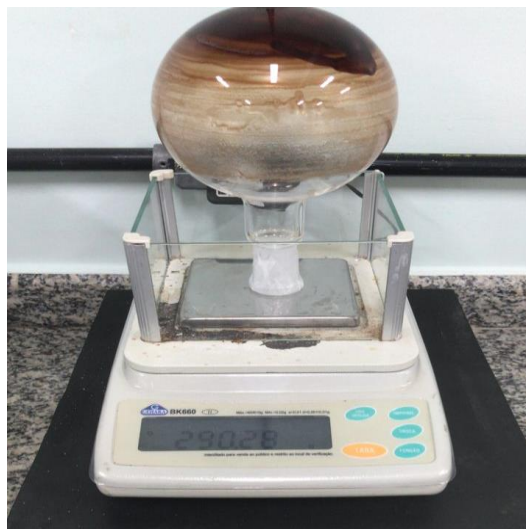


Figura 2. Amostra contida no rotaevaporador a 80 rotações por minuto.
Fonte: os autores.

4.5 Cultivo e manutenção do fungo *C. 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 (PACHECO *et al.*, 2015).

4.6 Determinação da concentração inibitória mínima em microplaca (CIM)

Esta etapa objetiva determinar a concentração inibitória mínima capaz de inibir 100% da viabilidade celular de *C. albicans*. Um total de 1×10^4 células/mL foram adicionadas à placa de microtitulação de 96 poços na ausência ou presença de extrato de *C. urucurana* e incubadas em estufa a 37 °C. Após incubação por 24 horas, foram adicionados 20 µL de resazurina (solução a 0,01%), com nova incubação por mais 24 horas. A concentração que inibe 100% foi determinada por leitura visual, considerando a menor concentração de *C. urucurana* capaz de impedir a conversão da cor azul do corante para a rosa. Os ensaios foram realizados em triplicata (VASCONCELOS *et al.*, 2014).

4.7. Avaliação de danos na parede celular de *C. albicans* causado por *C. 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 Turecka e colaboradores (2018), 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. Desse modo, a CIM foi determinada na presença de 0,8M de sorbitol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), sob as mesmas condições descritas anteriormente. 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 determinam a parede celular como um dos possíveis alvos celulares de *C. urucurana*. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.8. Avaliação do dano à membrana plasmática causado por *C. urucurana* em *C. albicans*

O ensaio para avaliação dos possíveis danos à membrana plasmática promovidos por *C. urucurana* nas células de *C. albicans*, foi realizado conforme descrito por Turecka e colaboradores (2018), 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, a CIM foi determinada na presença de 400 µg/mL de ergosterol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), sob as mesmas condições descritas anteriormente. O ergosterol foi previamente diluído em DMSO, aquecido e filtrado em filtro de 0,22 µM. Sabe-se 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.

4.9 Avaliação do dano mitocondrial causado por *C. urucurana* em *C. albicans*

O método colorimétrico com o emprego de resazurina foi utilizado para avaliar a viabilidade das células de *C. albicans* 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 foram adicionadas à placa de microtitulação de 96 poços na ausência ou 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 que inibe 100% da função mitocondrial foi determinada por leitura visual, considerada a menor concentração de *C. urucurana* em que não houve mudança da cor azul para rosa (RISS *et al.*, 2016).

4.10 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 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 (cor original do reagente) para rosa. O índice de seletividade dos compostos foi calculado dividindo a concentração citotóxica em células MRC-5 pela CIM (GATTI *et al.*, 2018).

5. RESULTADOS

5.1 Rendimento do extrato de *C. urucurana*

Depois do período de secagem, as entrecasas de *C. urucurana* foram trituradas e, em seguida, foram feitas a pesagem e o cálculo do rendimento, como ilustrado na tabela 1.

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

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

ES= Extrato sólido; EE= Extrato etanólico

A partir de 53,77g de entrecasca, foi obtido 2,82g de extrato etanólico. Desse modo, o percentual de rendimento de extrato foi de 5,2%.

5.2 Avaliação dos danos causados por *C. urucurana* em *C. albicans*

Esse ensaio foi realizado com extrato hidroalcoólico de *C. urucurana*, em que *C. albicans* foi cultivada em Meio RPMI + *C. urucurana*. Ao se analisar a imagem 3, interpreta-se que a concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração em que houve atividade da enzima desidrogenase mitocondrial de *C. albicans*. Logo, a CIM é de 375 mg/mL.

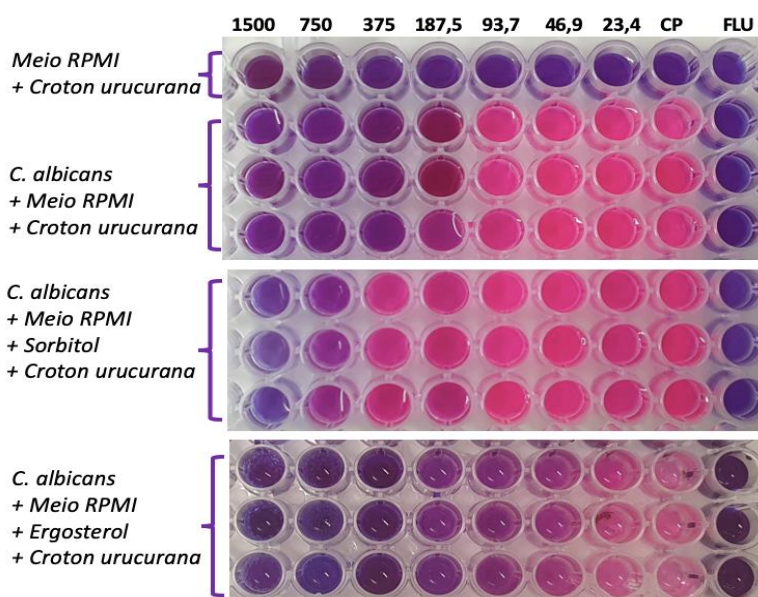


Figura 3. Concentração inibitória mínima e avaliação de danos na parede e membrana celular. As concentrações de *C. urucurana* estão em mg/mL. CP - Controle Positivo de crescimento (Meio RPMI + células). FLU- Controle negativo de crescimento – Meio RPMI + células + Fluconazol na concentração de 2 mg/mL.

Verifica-se que para as células de *C. albicans* cultivadas na presença de sorbitol, a CIM foi de 1500 mg/mL, em comparação à CIM de 375 mg/mL na ausência de sorbitol. Desse modo, demonstra-se que as células ficaram mais resistentes à ação antifúngica de *C. urucurana* na presença de sorbitol. Quando há danos à parede celular, as células tendem a sofrer estresse osmótico e o sorbitol atua como protetor osmótico. Assim, se *C. urucurana*, na presença de sorbitol, perde seu efeito antifúngico, pode-se afirmar que um dos seus danos celulares é referente à parede celular.

É possível perceber que nas concentrações testadas, empregado o teste colorimétrico por resazurina, outro dano pode ser visualizado. A resazurina é efetivamente reduzida nas mitocôndrias, o que a torna útil para estudar a atividade metabólica mitocondrial. Ela serve como um indicador de reação de oxirredução (redox) e tem uma cor azul quando diluída em água. Depois de entrar na célula, em resposta à atividade metabólica das células vivas, é reduzida à resorufina, de cor rosa. Logo, pode ser inferido também que, na concentração de 375 mg/mL, as células tiveram a atividade mitocondrial prejudicada. Assim, este ensaio também avalia o dano funcional da célula através da sua atividade mitocondrial.

Em relação ao dano à membrana plasmática, não foi observado valores maiores de CIM no meio com ergosterol, o que implica que a planta *C. urucurana* não apresenta esse tipo de atividade em *C. albicans*.

5.3 Avaliação da citotoxicidade de *C. urucurana* em células humanas

Com o uso de uma concentração de células MRC-5 de 1×10^5 células/mL, é possível constatar que a concentração em que o extrato de *C. urucurana* se demonstrou citotóxico em células humanas é de 375 mg/mL. Considerando que o valor da CIM em *C. albicans* foi o mesmo, pode-se afirmar que, apesar de ter atividade antifúngica, a *C. urucurana* é tóxica para este tipo celular (MRC-5), como observado pela interpretação da imagem 4.

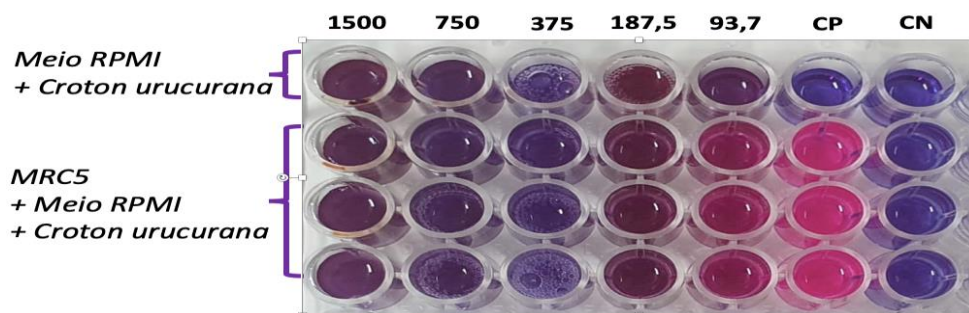


Figura 4. Citotoxicidade em células de fibroblastos MRC-5. CP - Controle Positivo (meio + célula), CN - Controle Negativo (apenas meio). As concentrações de *C. urucurana* estão em mg/mL.

5.4 Índice de seletividade de *C. urucurana*

O índice de seletividade foi calculado conforme descrito por Silva e colaboradores (2020), por meio da fórmula $IS = CC$ (concentração citotóxica)/ CIM (concentração inibitória mínima), ou seja, $IS = 375/375 = 1$, demonstrando um índice de seletividade baixo.

6. DISCUSSÃO

Segundo Oliveira e colaboradores (2016), 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. De acordo com Tiwari e colaboradores (2011), os métodos extrativos para vegetais são diversos e incluem maceração, infusão, percolação, decocção, entre outros. Além da diversidade do procedimento de extração, há muitos 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.

Em comparação com outras pesquisas semelhantes a esta, pode-se perceber algumas diferenças no que tange ao rendimento obtido pela amostra. Nos trabalhos de Monteiro (2015) e no de Vieira e colaboradores (2017), foi visto um rendimento de 8,2%, em comparação com os 5,2% encontrados nesta pesquisa. Ao se analisar as metodologias de cada estudo, a fim de encontrar razões que explicassem essa grande diferença nos rendimentos, o único item encontrado foi o tempo de extração da amostra no etanol. Enquanto o material desta pesquisa foi extraído em álcool etílico por 48 horas, os outros analisados foram extraídos por 72 horas. Todas as outras etapas de obtenção do extrato foram semelhantes.

No entanto, este trabalho seguiu a metodologia proposta pelo estudo de Pacheco e colaboradores (2015), que evidenciou 24 horas como suficiente para extrair uma quantidade satisfatória de compostos da entrecasca de *C. urucurana*. Além disso, o estudo de Zuchinalli (2009) obteve rendimento semelhante ao desta pesquisa e conseguiu resultados efetivos.

Outro fator discrepante entre este trabalho e os de outros autores, que possa explicar a diferença entre os percentuais de rendimento obtido, é o solvente orgânico utilizado para a extração. Nos trabalhos de Peres e colaboradores (1997), Wolff e colaboradores (2012) e no de Barbieri e colaboradores (2020), 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 Casão e colaboradores (2020) utilizou como extrator também o etanol, em semelhança ao presente trabalho, mas com volume de 95% e não de 99%, obtendo rendimento de 6,44%.

Para se estudar a ação de *C. urucurana* na parede celular de *C. albicans*, foi realizado um ensaio com sorbitol, um 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 (TURECKA *et al.*, 2018).

Tento em vista essa 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*, o que permite afirmar que um dos danos citotóxicos é referente à parede celular de *C. albicans*.

Afim de avaliar o possível efeito antifúngico de *C. urucurana* na membrana celular fúngica, 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, não encontrado em células humanas ou animais, tornando-se um alvo farmacológico de grande importância para a maioria dos antifúngicos (TURECKA *et al.*, 2018).

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 (TURECKA *et al.*, 2018). Dessa forma, não foram observados valores maiores de CIM no meio com ergosterol, o que sugere que a planta *C. urucuruana* não apresenta esse tipo de atividade em *C. albicans*.

Em relação à avaliação do dano mitocondrial, foi empregado o teste colorimétrico de redução por resazurina. Sabe-se que essa substância é um indicador redox com permeabilidade celular, que pode ser dissolvida em tampões fisiológicos, resultando em uma solução de coloração azul, que pode ser adicionada diretamente às células em cultura, já que as células viáveis com metabolismo ativo podem reduzir a resazurina no produto resorufina, que é rosa fluorescente. Diante disso, a resazurina é efetivamente reduzida nas mitocôndrias, o que a torna

um teste útil, barato e sensível para o estudo da atividade metabólica mitocondrial (RISS *et al.*, 2016).

Logo, pode ser inferido que na concentração de 375 mg/mL, as células de *C. albicans* tiveram a sua atividade mitocondrial prejudicada, não sendo observado a alteração colorimétrica de azul para rosa, o que confirma que *C. urucurana* apresenta efeitos danosos à atividade mitocondrial fúngica.

Ao se descrever os locais de ação da planta, cabe comparar com os apresentados pelos medicamentos do esquema tradicional de tratamento de candidíase. As principais opções são miconazol, nistatina, fluconazol e anfotericina B (BRASIL, 2020). Todos esses medicamentos agem na membrana celular, comprometendo a ação citotóxica dos fungos (HILAL-DANDAN, 2015). Dessa maneira, pode-se afirmar que a *C. urucurana* possui local e mecanismo de ação completamente diferentes dos principais medicamentos do esquema tradicional.

De acordo com o ensaio *Antifungal activity of Copaíba resin oil in solution and nanoemulsion against Paracoccidioides spp* de Silva e colaboradores (2020), 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 como descrito anteriormente, 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, perdendo rapidamente a capacidade metabólica de reduzir a resazurina e, portanto, não produzindo sinal fluorescente. Considerando que a CIM em *C. albicans* foi a mesma, pode-se constatar que, apesar da *C. urucurana* apresentar atividade antifúngica, essa oferece toxicidade a esse tipo celular (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 de estimar uma possibilidade de relação entre o ensaio in vitro e a passagem segura para ensaio in vivo de compostos sintéticos ou naturais (PROTOPOPOVA *et al.*, 2005).

Visto isso, 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 (PROTOPOPOVA *et al.*, 2005) como foi observado nesta pesquisa. Portanto, *C. urucurana* não apresenta uma margem de segurança confiável e demonstrável que permita a utilização dessa concentração de entrecasca enquanto potencial fármaco antifúngico no tratamento de candidíase em humanos.

Assim, pode-se constatar que o potencial princípio ativo obtido a partir de extrato e reduções da entrecasca de *C. urucurana* apresentam 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, pode-se ressaltar o miconazol, cuja concentração citotóxica em que se observam efeitos em células humanas é muito superior à concentração mínima em fungo, o que descarta um potencial citotóxico de relevância (CASTRO, 2016). Dessa forma, percebe-se que os medicamentos do esquema tradicional possuem CIM na *C. albicans* bem menores, com um potencial de citotoxicidade inferior quando comparado à *C. urucurana* (CASTRO, 2016). Ou seja, esses fármacos seriam bem 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.

Afim de servir como preditor científico para pesquisas adiantes, propõe-se que haja uma investigação científica que se baseie em análises clínicas mais aprofundadas consoantes à avaliação laboratorial dos danos e 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 e comum de que o

potencial fitoterápico de plantas conhecidas delegam 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, cicatrizantes, dentre outros (ANTONIAZZI, 2016). Contudo, neste estudo, apesar de ter apresentado atividade antifúngica, a *C. ururcurana* também apresentou potencial de toxicidade em humanos, o que ilustra um escopo de restrição a seu uso. Outros estudos, como o de Mesquista e colaboradores (2016), 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, pode ser que em outros tecidos/linhagens de células, os efeitos citotóxicos sejam diferentes. Além disso, também pode servir como preditor para estudos seguintes analisarem a *C. ururcurana* como um potencial fármaco tópico, já que, nessa forma, provavelmente 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.

7. 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 constatado, 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 tanto os tipos de danos já estabelecidos de forma comparativa quanto outros potenciais mecanismos ação citotóxica fúngica, a fim de se obter pesquisas com maior número de evidências e esclarecimentos pontuais acerca do espectro de efeitos antifúngicos da *C. urucurana*. Além disso, é relevante considerar a possibilidade de testagem em outros compostos da planta, como látex, ou mesmo isolamento de moléculas 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 promoção enquanto fármaco candidato antifúngico.

8. REFERÊNCIAS

ABI-SAID, D., *et al.* The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clin Infect Dis**, v. 24, p. 1122-8, 1997.

ALONSO-VALLE, H., *et al.* Candidemia in tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. **Europ Clin Microbiol Infect Dis**, v. 22, p. 254-7, 2003.

ANTONIAZZI, C.A., *et al.* Estudo etnobotânico de croton urucurana baill (euphorbiaceae) na comunidade salobra grande, porto estrela-mt. **Biodiversidade**. V. 15, n. 2, p: 40 -52, 2016.

BARBIERI, D.S.V., *et al.* Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Archives of oral biology**, v. 59, p. 887-96, 2014.

BETONI, J.E.C.; MANTOVANI, R.P.; BARBOSA, L.N.; STASI, L.C.D.; JUNIOR, A.F. Synergism Between Plant Extract and Antimicrobial Drugs Used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 387-390, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de políticas de saúde. Departamento de atenção básica área técnica de dermatologia sanitária. **Dermatologia na Atenção Básica de Saúde**. Cadernos de Atenção Básica Nº 9 Série A - Normas de Manuais Técnicos; nº 174. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de DST, Aids e hepatites virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis**. Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST). Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

BUTLER, M.S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**, v. 12, n. 67, p. 2141-2153, 2004.

CÂNDIDO-BACANI, P.M., *et al.* Cytotoxic Orbitide from the Latex of *Croton urucurana*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 11, p. 2754-2760, 2015.

CASÃO, T.D.R.L., *et al.* *Croton urucurana* Baillon stem bark ointment accelerates the closure of cutaneous wounds in knockout IL-10 mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 261, 2020.

CASTRO, I.M.N., *et al.* Comparação da atividade de antifúngicos imidazólicos e triazólicos frente a *Candida albicans*. **RBAC**, v. 48, n. 3, p. 216-22, 2016.

CORDEIRO, K.W., *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 128-135, 2016.

CORTÉS, J.A., *et al.* Candidemia in Colombia. **Biomedica**, v. 40, n. 1, p. 195-207, 2020.

FARNSWORTH, N.R., *et al.* Medicinal Plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 6, n. 63, p. 965-981, 1985.

GATTI, T.H.H., *et al.* Insulin-loaded polymeric mucoadhesive nanoparticles: development, characterization and cytotoxicity evaluation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 0, p.1-10, 2018.

GIOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Bras Patol Med**, v.46, n.3, p. 225-234, 2010.

HILAL-DANDAN, RANDA, E LAURENCE BRUNTON. Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman & Gilman. Disponível em: Minha Biblioteca, (2nd edição). Grupo A, 2015.

KUMAMOTO, C.A.; VINCES, M.D. Contributions of hyphae and hyphae-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. **Cell Microbiol**, v. 7, p. 1546-54, 2005.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, p. 17-31, 2013.

LATADO, A., *et al.* Tratamento de Infecções Fúngicas. **Núcleo de Epidemiologia Clínica e Medicina Baseada em Evidências (NEC)**, 2012.

LEITE, T., *et al.* Antimicrobial, modulatory and chemical analysis of the oil of *Croton limae*. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n.1, p.2015–2019, 2017.

LI, T. *et al.*, Evaluation of the vaginal microbiome in clinical diagnosis and management of vaginal infectious diseases. **Chinese Medical Journal**, v. 132, n.9, p. 1100-1103, 2019.

LIMA T., *et al.* *Candida albicans* de mucosa vaginal: morfotipagem e produção de proteinase. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 6570, 2004.

MAYER, F.L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanism. **Virulence**, v.4, n.2, p.119-128, 2013.

MESQUITA, D.D; CIAPPINA, A.L, ALMEIDA., L.M., Avaliação do potencial tóxico do látex de *Croton urucuruana*. In: III congresso de ensino, pesquisa e extensão UEG. 2016.

MONTEIRO, L.P. **Determinação da Atividade Citotóxica do Extrato Vegetal de *Croton Urucuruana* Baill em Linhagens De Células Tumorais**. 86f, 2015. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Bioquímica Aplicada), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2015.

MORAES, T.M.S., *et al.* Antimycobacterial Activity and Alkaloid Prospection of Psychotria Species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic Rain Forest. **Planta Med**, n.77, p. 964-970, 2010

NICHOLLS, S., *et al.* Ativação do fator de transcrição de choque térmico Hsf1 é essencial para a virulência completa do patógeno fúngico *Candida albicans*. **Fungo Genet Biol**, v. 48, p. 297-305, 2011.

OLIVEIRA, V.B., *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clausura de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook, Dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, v. 18, n.1, p.230-239, 2016.

PACHECO, D.R., *et al.* Avaliação da atividade antifúngica de *Curcuma longa* sobre *Candida parapsilosis*. **Rev Patol Trop**, v. 44, n.3, p. 258-270, 2015.

PAPPAS, P.G., *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. 1-50, 2016.

PERES, M., *et al.* Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 3, p. 209-211, 1998.

PERES, M.T., *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, n. 3, p. 223-226, 1997.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA D.J. Epidemiologia das micoses invasivas na América do Norte. **Crit Rev Microbiol**, v. 36, p. 1-53, 2010.

PRADO, R.S. Proteomic profile response of *Paracoccidioides lutzii* to the antifungal argenti-lactone. **Frontiers in microbiology**. v. 6, n. 616, p. 1-14, 2016.

PROTOPOPOVA, M., *et al.* Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ 109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, p. 968-974, 2005.

RANE, H., *et al.* *Candida albicans* VMA3 is necessary for V-ATPase Assembly and function and contributes to secretion and filamentation. **Eukaryotic Cell**, v.12, n.10, 2013.

REVANKAR, S.G. Candidíase (invasiva). **Manual MSD Versão para Profissionais de Saúde**, 2017.

RISS, T.L., *et al.* Cell Viability assays. **Assay Guidance Manual**, 2014.

ROBERTSON, K.D., *et al.* Esophageal Candidiasis. **StatPearls Publishing**, 2020.

ROSSITER, S. E. Natural Products as Platforms to Overcome Antibiotic Resistance. **Chemical Reviews**, v. 19, n. 117, p. 12415-12474, 2017.

SARDI, J.C.O., *et al.* *Candida* Species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical Microbiology**, v. 62, p. 10-24, 2013.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Aspectos clínico-laboratoriais das dermatofitoses. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**, p.135-161, 2004.

SILVA, L.C., *et al.* Antifungal activity of Copaíba resin oil in solution and nanoemulsion against *Paracoccidioides* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 125-134, 2020.

SIMIONATTO, E., *et al.* Chemical Composition and Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities of the Essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) Stem Bark. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 18, n. 5, p. 879-885, 2007.

TIWARI, P. *et al.* Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v.1, n.1, p. 98-106, 2011.

TURECKA, K., *et al.* Antifungal Activity and Mechanism of Action of the Co (III) Coordination Complexes With Diamine Chelate Ligands Against Reference and Clinical Strains of *Candida* spp. **Front. Microbiol.**, v.9, p.1-14, 2018.

VASCONCELOS, L.C., *et al.* Cell viability of *Candida albicans* against the antifungal activity of thymol. **Brazilian Dental Journal**, v. 25, n. 4, p. 277-281, 2014.

VIEIRA, G.T., *et al.* Atividade citotóxica do extrato de *Croton urucurana* Baill contra linhagens de células leucêmicas humanas U937 e THP1. **Ciência e Natura**, v. 39, n.3, p. 512-519, 2017.

VILA, T., *et al.* Oral candidiasis: A disease of opportunity. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 1-28, 2020.

WILLEMS, H.M.E., *et al.* Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions, v. 6, n. 1, p. 27, 2020.

WOLFF, C.K., *et al.* Antiulcerogenic effect of *Croton urucurana* Baillon bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 331–337, 2012.

ZUCHINALLI, A. **Estudo de propriedades químicas e biológicas da espécie vegetal *Croton urucurana***. 2009. 91 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em química)- Faculdade de química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.