



Universidade Federal do Acre
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental

***Efeito *in vitro* da associação do ultrassom ao *Croton*
lechleri sobre a inibição de *Candida albicans****

Marcio dos Santos Romualdo

Rio Branco - Acre

2023

Efeito *in vitro* da associação do ultrassom ao *Croton lechleri* sobre a inibição de *Candida albicans*

Marcio dos Santos Romualdo

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Maggi.

Co-Orientador: Prof. Dr. Wagner Coelho de Albuquerque Pereira.

Rio Branco - Acre

2023



Universidade Federal do Acre
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental

Marcio dos Santos Romualdo

**Efeito *in vitro* da associação do ultrassom ao *Croton lechleri* sobre a inibição de
*Candida albicans***

Dissertação aprovada em 27 de novembro de 2023, pela banca examinadora
constituída pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Luís Eduardo Maggi
Universidade Federal do Acre
Orientador

Prof. Dr. Anselmo Fortunato
Ruiz Rodriguez
Universidade Federal do Acre
Membro da Banca Examinadora

Profa. Dra. Tamyres Izarely Barbosa da
Silva
Universidade Federal do Acre
Membro da Banca Examinadora

Rio Branco - Acre

2023

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

R184e Romualdo, Marcio dos Santos, 1973 -

Efeito *in vitro* da associação do ultrassom ao *Croton lechleri* sobre a inibição de *Candida albicans* / Márcio dos Santos Romualdo; Orientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Maggi, Co-Orientador: Prof. Dr. Wagner Coelho de Albuquerque Pereira – 2023.

67f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

1. *Candida albicans*. 2. *Croton lechleri*. 3. Ultrassom. I. Maggi, Luís Eduardo (Orientador). II. Pereira, Wagner Coelho de Albuquerque (Co-Orientador). III. Título.

CDD: 636.2

DEDICATÓRIA

Gratidão à Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia. Ele que me presenteia todos os dias com o dom da vida, que me dá forças e coragem para seguir em frente e atingir os meus objetivos. Sua presença me auxilia nas minhas escolhas, abrindo caminhos, segurando a minha mão, me dando confiança frente as adversidades, me acompanhando rumo à realização dos meus sonhos e superando meus desafios. Sem Deus a conclusão deste curso seria impossível.

Dedico o resultado desta caminhada acadêmica, em primeiro lugar, a minha família, sobretudo à minha esposa Daniele Romualdo e a minha filha Luísa Romualdo, base da minha força. Por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu já duvidava. Vocês são os meus maiores exemplos de pessoas, verdadeiros pilares de esperança, sabedoria e respeito a Deus. Tenho a certeza de que, sem a minha base familiar, este sonho não teria sido realizado. É com muito amor que lhes dedico este trabalho.

Dedico este trabalho também aos meus pais que, desde cedo, me ensinaram o valor da educação para se entender o mundo. Eles sempre me mostraram, com muita paciência e amor, que não há limites para a busca de um sonho, para se querer sempre mais da vida e ser feliz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Orientador Prof. Dr. Luís Eduardo Maggi pelos ensinamentos, paciência, dedicação, solicitude, motivação, disponibilização e confiança ao longo das orientações precisas e pontuais. Sua capacidade docente de excelência é elogiável.

Agradeço à banca avaliadora, que participou ativamente no desenvolvimento deste trabalho com seus ensinamentos, sugestões, dicas e compartilhamento de ideias. Em especial aos Professores Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez, Dr. Wagner Coelho de Albuquerque Pereira e a Dra. Tamyres Izarely Barbosa da Silva pela disponibilização do laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais do Curso de Medicina Veterinária da UFAC. A colaboração da Professora Tamyres foi decisiva para o êxito deste trabalho, bem como, sua capacidade técnica aliada a humanização ficaram eternizadas.

Agradeço ao Prof. Dr. João Rafael Valentim Silva e ao Prof. Dr. Kennedy Maia dos Santos pelo apoio incondicional e motivação nos momentos decisivos.

Gratidão aos funcionários de apoio da UFAC, bem como, a todos os professores pela partilha do saber. Obrigado pelo auxílio ao longo do curso e pela infinita paciência para me ensinar. Foram momentos de aprendizagem inesquecíveis.

Aos colegas parceiros de experimentos laboratoriais do curso de Doutorado: Jaíne Rodrigues da Rocha, Adna Rocha de Araújo Maia e Romáina Idayara Silva de Araújo, em especial a Jaíne e Adna pela disponibilidade sem medir esforços. A todos os colaboradores do Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais do Curso de Medicina Veterinária da UFAC ao longo dos experimentos: Jhonatan Henrique Lima da Rocha, Rebeka Sombra da Costa, Juliana Cristina Moraes de Almeida, Gabriela de Souza Ferreira, Nycole dos Santos Queiroz e Alcinete Virgínia Alemão.

Aos colegas de turma que convivi e me acompanharam ao longo do curso, que me encorajaram ao longo destes dois anos. Pelos bons momentos partilhados, essenciais para o meu bem-estar social e intelectual.

EPIGRAFE

“Ter fé é assinar uma folha em branco e deixar que Deus nela escreva o que quiser.”

“Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a sabedoria.”

Santo Agostinho

RESUMO

Neste estudo avaliamos o efeito *in vitro* do ultrassom associado a diferentes concentrações de *C. lechleri* sobre a inibição de *C. albicans*. Para a realização do experimento foi utilizada a cepa padrão de *C. albicans* (AATCC®10231TM). Suspensões planctônicas de *C. albicans* foram expostas a tratamento com ultrassom na frequência de 1 MHz, com intensidade de 1 W/cm² por 5 minutos. O experimento contou com dois ensaios laboratoriais em dias distintos, com a mesma metodologia. Foram utilizados os tratamentos: Fluconazol (controle positivo), ultrassom sozinho (UST), ultrassom associado ao Fluconazol (UST+FLU), *C. lechleri* nas concentrações de 100 µL (C1100) e 150 µL e (C1150) e ultrassom associado ao *C. lechleri* (UST+C1100) e (UST+C1150). A associação do UST+C1100 obteve o resultado mais significativo, com médias de 224±43,6 UFC (Unidade Formadora de Colônia) e 1,97% de área percentual ocupada em placa, bem como, o índice de inibição relativa de 80,53% e 95,34% relacionados à UFC e área percentual respectivamente. O programa ImageJ representou uma poderosa ferramenta para a contagem automatizada de UFC, visto que sua análise amplia a interpretação da inibição de *C. albicans* consoante à área percentual, tamanho médio e área total. De acordo com os resultados experimentais obtidos, a associação do ultrassom ao *C. lechleri* tem grande potencial para aplicação na medicina, podendo ser considerada uma estratégia promissora para o tratamento das infecções causadas por *C. albicans*.

Palavras-chave: *C. albicans*; *C. lechleri* e Ultrassom.

ABSTRACT

In this study we evaluated the effect in vitro of ultrasound associated with different concentrations of *C. lechleri* for inhibition of *C. albicans*. To carry out the experiment, the standard strain of *C. albicans* (AATCC®10231TM) was used. Planktonic suspensions of *C. albicans* were exposed to ultrasound treatment at 1 MHz frequency, and intensity of 1 W/cm² for 5 minutes. Two experiments were conducted on different days with the same methodology. The following treatments were used: Fluconazole (positive control), ultrasound alone (UST), ultrasound associated with Fluconazole (UST+FLU), *C. lechleri* at concentrations of 100 µL (CI100) and 150 µL and (CI150) and ultrasound associated with *C. lechleri* (UST+CI100) and (UST+CI150). The association of UST+CI100 obtained the most significant result, with averages of 224 ± 43,6 UFC and 1,97% of percentage area occupied on the plate, as well as a relative inhibition index of 80,53% and 95,34% related to CFU and percentage area respectively. The ImageJ program represented a powerful tool for automated CFU counting, as its analysis broadens the interpretation of *C. albicans* inhibition depending on percentage area, average size and total area. According to the experimental results obtained, the association of ultrasound with *C. lechleri* has great potential for application in medicine, and can be considered a promising strategy for the treatment of infections caused by *C. albicans*.

Keywords: *C. albicans*; *C. lechleri* and Ultrasound.

LISTAS DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Recipiente plástico adaptado e confeccionado utilizando-se um galão de cinco litros para uso do transdutor de ultrassom submerso em água. | 30 |
| Figura 2: A- Técnica de semeadura por esgotamento. B- Crescimento fúngico após incubação por 24 h a 37° C. | 31 |
| Figura 3: Inoculação de duas colônias em 100 ml de caldo Sabouraud Dextrose por 24 h a 37° C. | 32 |
| Figura 4: Preparação das suspensões fúngicas na escala 0,5 Mc Farland. | 32 |
| Figura 5: Centrifugação das suspensões fúngicas a 3.600 rpm por 15 minutos. | 33 |
| Figura 6: Preparação e acondicionamento de quatro caldos distintos. | 33 |
| Figura 7: A- Ressuspensão fúngica em 1 ml de solução salina fisiológica. B e C- Transferência das ressuspensões fúngicas para as placas de acrílico. | 34 |
| Figura 8: Exposição das suspensões fúngicas dos grupos UST, UST+FLU, UST+C. <i>lechleri</i> 100 µL e UST+C. <i>lechleri</i> 150 µL ao Ultrassom. | 35 |
| Figura 9: A- Semeadura pela técnica de esgotamento e espalhamento com o auxílio de uma alça de Drigalski em placas com meio ASD. B- Placas de Petri incubadas por 24 h a 37° C. | 35 |
| Figura 10: Funções disponíveis no <i>Menu</i> inicial do <i>software</i> ImageJ. | 36 |
| Figura 11: A- <i>Menu File/Open (Ctrl+O)</i> . B- Seleção de um arquivo de imagem no formato JPG. | 37 |
| Figura 12: <i>Menu Edit/Clear outside</i> | 37 |
| Figura 13: <i>Menu ImageJ/Type/8 bits</i> | 38 |
| Figura 14: <i>Menu Image/Adjust/Threshold</i> | 38 |
| Figura 15: <i>Menu Process/Binary/Watershed</i> | 39 |
| Figura 16: <i>Menu Analyse/Analyse particles</i> | 39 |
| Figura 17: Valor médio das UFC de <i>C. albicans</i> submetidas aos tratamentos com <i>C. lechleri</i> associados ou não ao ultrassom nas concentrações de 100 e 150 µL na frequência de 1 MHz e intensidade de 1 W/cm ² por 5 minutos de exposição. | 43 |
| Figura 18: Valor médio da área infectada por <i>C. albicans</i> , submetidas aos tratamentos com <i>C. lechleri</i> associados ou não ao ultrassom nas concentrações de 100 e 150 µL na frequência de 1 MHz e intensidade de 1 W/cm ² por 5 minutos de exposição. | 44 |

| | |
|--|----|
| Figura 19: Placas com registro de UFC e área percentual ocupada por colônias formadoras de <i>C. albicans</i> dos grupos controle, <i>C. lechleri</i> 100 µL e UST..... | 46 |
| Figura 20: Placas com registro de UFC e área percentual ocupada por colônias formadoras de <i>C. albicans</i> dos grupos UST+FLU, UST+ <i>C. lechleri</i> 100 µL e UST+ <i>C. lechleri</i> 150 µL. | 47 |
| Figura 21: Valor médio das UFC de <i>C. albicans</i> submetidas aos tratamentos com <i>C. lechleri</i> associados ou não ao ultrassom nas concentrações de 100 e 150 µL na frequência de 1 MHz e intensidade de 1 W/ cm ² no tempo de 5 minutos de exposição. | 51 |
| Figura 22: Valor médio da área infectada por <i>C. albicans</i> , submetidas aos tratamentos com <i>C. lechleri</i> associados ou não ao ultrassom nas concentrações de 100 e 150 µL na frequência de 1 MHz e intensidade de 1 W/ cm ² no tempo de 5 minutos de exposição. | 52 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) das UFC dos ensaios A e B..... | 40 |
| Tabela 2: Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) das áreas percentuais dos ensaios A e B. | 41 |
| Tabela 3: Tamanho médio e área total das UFC dos ensaios A e B..... | 44 |
| Tabela 4: Análise da reprodutibilidade. Coeficiente de Pearson, α de Cronbach e ω de McDonald das UFC e área percentual ocupada..... | 48 |
| Tabela 5: Média, desvio padrão, coeficiente de variação, valor P e índice de inibição relativa das UFC do experimento, submetidos a tratamento com <i>C. lechleri</i> associados ou não ao ultrassom com frequência de 1 MHz e intensidade de 1 W/cm ² , no tempo de 5 minutos. | 49 |
| Tabela 6: Média, desvio padrão, coeficiente de variação, valor P e índice de inibição relativa da área percentual de colônias formadoras de <i>C. albicans</i> do experimento, submetidos a tratamento com <i>C. lechleri</i> associados ou não ao ultrassom com frequência de 1 MHz e intensidade de 1 W/cm ² , no tempo de 5 minutos..... | 50 |

LISTA DE SIGLAS

AmB- Anfotericina B

ASD- Ágar sabourand dextrose

CIM- Concentração inibitória mínima

CONT- Controle

CV- Coeficiente de variação

DP- Desvio padrão

EMA- Agência Européia de Medicamentos

FAD- Administração Federal de Medicamentos

FLU- Fluconazol

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

LADIA- Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais

OMS- Organização Mundial da Saúde

UFAC - Universidade Federal do Acre

UFC- Unidades Formadoras de Colônias

UST- Ultrassom terapêutico

SUMÁRIO

| | | |
|-----|---------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 17 |
| 2.1 | <i>Candida albicans</i> | 17 |
| 2.2 | Terapia antifúngica | 19 |
| 2.3 | <i>Croton lechleri</i> | 23 |
| 2.4 | Ultrassom | 25 |
| 3 | OBJETIVOS | 28 |
| 3.1 | Objetivo Geral | 28 |
| 3.2 | Objetivos Específicos | 28 |
| 4 | MÉTODO | 29 |
| 4.1 | Técnica de semeadura por esgotamento | 31 |
| 4.2 | Inoculação em meio líquido | 31 |
| 4.3 | Centrifugação das suspensões fúngicas | 32 |
| 4.4 | Transferência das suspensões fúngicas | 34 |
| 4.5 | Exposição das suspensões ao Ultrassom | 34 |
| 4.6 | Ensaio de viabilidade celular | 35 |
| 4.7 | Análise automatizada ImageJ | 36 |
| 5 | RESULTADOS | 40 |
| 5.1 | Ensaio laboratoriais A e B | 40 |
| 5.2 | Experimento geral | 49 |
| 6 | DISCUSSÃO | 53 |
| 6.1 | Gênero <i>Croton</i> | 53 |
| 6.2 | Ultrassom | 56 |
| 7 | CONCLUSÃO | 59 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 60 |

1 INTRODUÇÃO

A *Candida albicans* é uma espécie de fungo comensal e oportunista que coloniza de forma assintomática vários nichos do corpo, incluindo o trato gastrointestinal, trato urogenital, mucosa do trato respiratório e pele de seres humanos, desde o nascimento como um componente da microbiota. A *C. albicans* é o agente causador de infecções mucosas e sistêmicas mais comuns, sendo responsável por 70% das infecções fúngicas em todo o mundo (1,2,3).

Nos últimos anos, a infecção e mortalidade por *C. albicans* apresenta crescimento rápido e considerável, desencadeando agravamentos de saúde e complicações clínicas, representando 50% das infecções fúngicas iatrogênicas principalmente em pacientes imunocomprometidos, bem como, representa a principal causa de infecções invasivas com risco de morte nas últimas décadas e, apesar do tratamento, a taxa de mortalidade é próxima de 40% principalmente em condições hospitalares (1,4).

Quando ocorre uma ruptura do equilíbrio biológico devido a fatores predisponentes de causas patológicas: neutropenia, doenças autoimunes (síndrome de Sjögren), Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, processos infecciosos, tumores e sua terapia, doenças do aparelho digestivo, diabetes, hipotireoidismo, hipoparatiroidismo; fisiológicas: deficiências nutricionais de ferro, ácido fólico e deficiência de vitaminas); imunológicas: imunossupressão de idosos, recém nascidos e grávidas e corticoterapia sistêmica; mecânicas: formação de biofilme e uso de cateter, além de fatores relacionados ao cuidado do paciente: antimicrobiano de longa duração, hospitalização de longo prazo, uso de cateter em cirurgias pode haver um aumento na multiplicação e invasão dos tecidos por estes microrganismos, ocasionando infecções denominadas candidíases (4,5).

As infecções associadas a biofilmes são de difícil tratamento, pois as estruturas microbianas apresentam resistência, tanto aos antimicrobianos quanto aos mecanismos de defesa do hospedeiro (1,5).

A terapia antifúngica da classe dos Azólicos, representada pelos Triazólicos e Imidazólicos é a mais utilizada. No tratamento da candidíase invasiva destacam-se os Triazólicos como o Fluconazol, as Equinocandinas e derivados Poliênicos, como a Anfotericina B. Tal medicamento apresenta reações adversas significativas em razão de suas características hepatotóxicas, nefrotóxicas e cardiotoxicas (3,6).

As infecções causadas por *C. albicans* são frequentemente tratadas com drogas Azólicas que inibem a biossíntese do Ergosterol. Como um Azol antifúngico representativo, o Fluconazol tem as características úteis de um amplo espectro antifúngico, baixos efeitos tóxicos e alta biodisponibilidade. É amplamente utilizado no tratamento clínico de infecções por *C. albicans*. No entanto, o Fluconazol é uma droga fungistática que inibe o crescimento, mas não mata o fungo patogênico, proporcionando, assim, a oportunidade para a seleção de cepas de maior resistência ao Fluconazol (7,8).

Croton lechleri é uma espécie da família *Euphorbiaceae* encontrada no noroeste da bacia amazônica, especialmente, na Amazônia brasileira-Acre, Equador e Peru. Seus metabólitos secundários característicos são as proantocianidinas, que representam até 90% da seiva seca, juntamente com outros polifenóis como as catequinas (10).

Esta árvore, conhecida por suas potenciais propriedades terapêuticas, produz um látex vermelho escuro conhecido como “sangue de dragão”. Este látex é usado para cicatrização de feridas, dor nas costas, estancar sangramentos, tratar doenças intestinais, bem como possui propriedades antifúngicas, bactericidas, antidiarreicas e analgésicas já comprovadas (10,11).

O ultrassom terapêutico, um equipamento largamente utilizado em fisioterapia apresenta propriedades que geram “efeitos biológicos”, dentre elas, a cavitação acústica (13). A cavitação acústica provoca a geração e o colapso de microbolhas em meio líquido, o que produz ondas de choque, facilitando a captação de antifúngicos devido ao aumento da permeabilidade da parede celular (14).

O uso do ultrassom de baixa frequência e intensidade associado à AmB lipossomal *in vitro* foi utilizado por Yang et al. (2018) como terapia adjuvante em infecções fúngicas, demonstrando um aumento significativo da inibição de *C. albicans* (15).

Em razão do grande potencial resistente desta espécie fúngica, bem como, o aumento indiscriminado do uso de drogas antifúngicas, busca-se encontrar alternativas

terapêuticas eficazes que possam minimizar complicações clínicas relacionadas a esta infecção tão emergente nos dias atuais (3,11).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* do ultrassom associado a diferentes concentrações do *C. lechleri* sobre a inibição de *C. albicans*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Candida albicans*

O gênero *Candida* compreende leveduras redondas ou ovaladas que acarretam uma diversidade de infecções que recebem o nome de candidíase. O curso dessas infecções depende muito do sistema imunológico do indivíduo, pois, a lesão pode se apresentar de diferentes formas, com sintomas distintos e cronicidade variada (16).

Candida possui aproximadamente 200 espécies diferentes de leveduras, destas somente 20 tem capacidade de causar algum tipo de infecção no homem, das quais a *C. albicans* se destaca sendo a principal espécie envolvida em infecções. Estudos indicam que esta espécie é responsável por 60% dos isolados de amostras clínicas (17).

A espécie de *Candida* mais comumente encontrada é *C. albicans*, um residente do trato intestinal humano e da superfície da mucosa genital que pode se transformar em um patógeno oportunista quando os sinais ambientais externos são alterados: ph, temperatura, umidade, imunocompetência, etc. (18).

Os patógenos que causam infecções fúngicas, como *Candida albicans*, são disseminados e podem afetar a pele e a superfície mucosa, podendo causar infecção sistêmica. Espécies de *Candida* estão presentes em até 400.000 doenças fúngicas sistêmicas (19).

A levedura *Candida* é um patógeno oportunista presente na microbiota normal, que pode crescer demais em indivíduos imunocomprometidos e causar infecções disseminadas (4). As infecções relacionadas à *Candida* estão se tornando uma ameaça universal à saúde humana, quando associados aos grupos de risco: imunocomprometidos, idosos, gestantes, neonatos, portadores de HIV ou outros vírus imunossupressores,

transplantados, pacientes portadores de neoplasias, em uso de dispositivos invasivos e submetidos a intervenção médica agressiva (2).

Condições de saúde imunocomprometidas, disbiose da microbiota ou alterações ambientais podem levar ao crescimento excessivo de *C. albicans*, causando infecções que variam desde infecções superficiais da mucosa até infecções graves disseminadas por via hematogênica (20).

A capacidade da *C. albicans* infectar o hospedeiro é consequência de diversos fatores de virulência e microbianos, exemplificados pelo polimorfismo, secreção de enzimas hidrolíticas e pela formação de biofilmes. Esses fatores resultam coletivamente em adesão, invasão e danos celulares (20,21).

Candida albicans aparece em diversas formas morfológicas (blastósporos, pseudohifas e hifas). Os blastósporos se dividem assexuadamente por brotamento. Durante esse processo, novo material celular é formado na superfície do blastósporo. O novo botão cresce a partir de um pequeno blastósporo selecionado e, na maioria das vezes, está localizado distalmente ao local de uma cicatriz causada pelo nascimento, após a qual começa a fase de crescimento. Após o término da fase de crescimento, as células se dividem, onde a filha se separa da célula mãe criando uma partição (22).

O polimorfismo implica a transição de *C. albicans* de uma forma comensal para uma forma patológica, que depende de mudanças no ambiente em que está localizado. É caracterizada pela transição morfológica dos blastósporos em hifas, e a forma de transição entre as pseudohifas (23).

A secreção de enzimas hidrolíticas está presente em *Candida albicans*. As enzimas hidrolíticas facilitam as características comensais e patogênicas, como a ligação ao tecido hospedeiro, causando a ruptura da membrana da célula hospedeira. Por causa destas enzimas, é possível a invasão das superfícies das membranas mucosas e dos vasos sanguíneos, e elas também participam no impedimento da resposta imunológica do hospedeiro. As três principais enzimas produzidas por *C. albicans* são SAP (aspartil protease secretada), fosfolipase e hemolisina (24).

A comunicação da célula com o ambiente externo ocorre através da membrana celular. Os esteróis na membrana celular são extremamente importantes, conferindo à

célula estabilidade, rigidez e resistência a estressores físicos. O Ergosterol é o esterol mais representado e é característico da membrana celular dos fungos (25).

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 (26).

A formação de biofilme é uma propriedade da patogênese da *C. albicans*. A maioria das infecções causadas por *C. albicans* está relacionada à criação de um biofilme na superfície do hospedeiro ou em superfícies abióticas (implantes), o que leva a alta morbidade e mortalidade. Como *C. albicans* pode fazer a transição morfológica de levedura para hifas, seu biofilme é uma estrutura complexa de diferentes formas morfológicas. O biofilme se desenvolve através de várias fases consecutivas (27).

Assim sendo, a levedura *C. albicans* 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 (28).

Dentre os fatores do hospedeiro relacionados às infecções fúngicas por *C. albicans* evidenciam-se o 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 (8).

Supõe-se que as taxas de incidência relativamente altas de *C. albicans* e não *C. albicans* estejam intimamente relacionadas com sua resistência recalcitrante a agentes antifúngicos convencionais, incluindo, por exemplo, Azólicos, Poliênicos e Equinocandinas (29). Uma preocupação crescente é a frequência de isolados multirresistentes de *C. albicans* e não *albicans*, que exibem resistência cruzada a Azólicos em pacientes especialmente de alto risco que recebem profilaxia antifúngica (3).

2.2 Terapia antifúngica

As infecções por *Candida albicans* fazem parte da microbiota normal em cerca de 50% dos indivíduos. Variam desde infecções superficiais debilitantes até infecções sistêmicas, invasivas e potencialmente fatais (30).

A formação de biofilmes é outro fator que aumenta a resistência dos microrganismos aos medicamentos. As células do biofilme mostram diferenças na morfologia, fisiologia e expressão gênica em comparação com a forma planctônica (31).

Os biofilmes são notórios por crescerem em dispositivos médicos implantados, como cateteres, marca-passos, dentaduras e articulações protéticas, que fornecem uma superfície para o crescimento do biofilme. Além dessas superfícies abióticas, os biofilmes também podem crescer em superfícies bióticas, como os revestimentos epiteliais das mucosas (32).

C. albicans é naturalmente sensível aos antifúngicos sistêmicos, eventualmente são resistentes a Anfotericina B (Poliênicos) e, são poucos os relatos de resistência às Equinocandinas. A resistência aos Azólicos está geralmente associada à exposição prolongada a estes fármacos. Infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida* são frequentemente tratadas com antifúngicos Azólicos, principalmente, o Fluconazol. A resistência a agentes antifúngicos, como a que acontece com o Fluconazol, pode ter diferentes origens (33).

O Fluconazol representa uma das principais linhas de profilaxia e terapia direcionada para candidíase. A infecção por *C. albicans* tem alta taxa de mortalidade, apesar da presença de tratamento antifúngico. No entanto, a aquisição de resistência não explica todas as falhas de tratamento. A tolerância aos antimicrobianos pode ser definida como a capacidade dos organismos de suportar a presença do agente antimicrobiano, sobreviver e resistir à morte em concentração superior à concentração inibitória mínima identificada (CIM). A tolerância aos Azólicos é amplamente descrita em *C. albicans* (22,23).

As Equinocandinas (Caspofungina, Micafungina ou Anidulafungina) são as drogas de escolha para a maioria dos casos de candidemia e candidíase invasiva, bem como, o esquema terapêutico para pacientes críticos ou gravemente enfermos por candidíase sistêmica (36). 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 e cateteres intravenosos, devem ser revertidas ou, se

possível, controladas. O tratamento da candidemia é mantido por 14 dias após a última hemocultura negativa (37).

A estratégia de tratamento da candidíase cutânea depende da localização da infecção, da sua extensão e do estado imunológico do paciente. A maioria geralmente responde a agentes antifúngicos tópicos, mas se o paciente estiver imunocomprometido, com áreas extensas afetadas ou não responder à terapia tópica é necessário tratamento sistêmico (37). Geralmente, a candidíase mucocutânea responde bem aos Azólicos tópicos (Miconazol, Clotrimazol e Econazol). Dos Poliênicos tópicos, a Nistatina é a mais utilizada, especialmente para candidíase oral e vulvovaginal (4). Se for necessário tratamento sistêmico, o Fluconazol é geralmente o medicamento de escolha (37). As escolhas alternativas são o Itraconazol ou um dos Triazólicos de segunda geração disponíveis. Se o paciente não responder ao tratamento com Azólicos, então a terapia com Anfotericina B deve ser tentada.

Os membros da classe de medicamentos antifúngicos Equinocandina (Micafungina, Anidulafungina, Caspofungina) também mostraram eficácia em infecções por *Candida*. O amplo espectro de atividade fungicida contra as espécies de *Candida*, os menores efeitos colaterais e perfil de interação favorável faz da Caspofungina a terapia de primeira linha para as diversas manifestações clínicas da candidíase (38).

Até recentemente, o Cetoconazol também era comumente usado, mas a EMA (European Medicines Agency) e a FAD (Federal drug Administration) retiraram-no devido ao potencial hepatotóxico e hoje seu uso está restrito apenas a infecções fúngicas complicadas e não responsivas (4).

Ao contrário da diversidade de classes de antibióticos disponíveis para uso contra patógenos bacterianos, a terapêutica de infecções fúngicas invasivas é limitada, pois há apenas três classes de fármacos convencionais utilizados. Dentre os antifúngicos utilizados na terapêutica de candidíases invasivas destacam-se os Azólicos, como Fluconazol, derivados Poliênicos, como Anfotericina B, e do grupo das Equinocandinas, a Caspofungina (39). O fenômeno da resistência a esses medicamentos se deve principalmente à prescrição indiscriminada e irracional: aumento de doses terapêuticas e uso prolongado, abandono de tratamento e falta de rigor na comercialização (4).

A eficácia limitada não é o único desafio terapêutico. Hoje, há uma resistência crescente dos patógenos aos agentes antifúngicos, e as espécies de *Candida* estão entre elas (40).

Entretanto, todas as classes possuem inconvenientes, como duração extensa do tratamento, toxicidade e alto custo, tornando-se obstáculos na adesão do paciente ao tratamento. Adicionalmente, observa-se um aumento na incidência de cepas multirresistentes, ou seja, caracterizadas pela resistência de pelo menos 3 classes de antifúngicos (41).

Infelizmente, essas opções de tratamento tornaram-se insatisfatórias devido ao aumento do desenvolvimento de resistência, à pressão seletiva, à indisponibilidade de antifúngicos convencionais para administração sistêmica e aos efeitos adversos em concentrações mais elevadas do medicamento (36).

As infecções fúngicas por *C. albicans* invasivas ou persistentes tem sido particularmente um problema no ambiente hospitalar, particularmente em pacientes imunocomprometidos. Principalmente devido ao pequeno arsenal terapêutico antifúngico, além do alto custo total do tratamento, efeitos adversos dos fármacos e aparecimento de cepas resistentes. Isso impulsiona a busca de alternativas a este cenário (42).

Além de conhecer os fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade de *C. albicans*, também é necessário o conhecimento dos fatores predisponentes essenciais para o desenvolvimento da candidíase. Desta forma, aumenta-se a possibilidade de prevenir a ocorrência de infecções causadas por *C. albicans*, e criam-se oportunidades para desenvolver novas possibilidades diagnósticas e terapêuticas (24).

O uso indevido de medicamentos antimicrobianos intensificou-se dramaticamente, gerando uma enorme preocupação nos sistemas de saúde devido ao surgimento de patógenos multirresistentes, afetando cerca de cinco milhões de pessoas em todo o mundo (43). Tais condições levaram a humanidade a uma era conhecida como pós-antibiótica, tornando as infecções mais fortes e os antibióticos inúteis (44).

2.3 *Croton lechleri*

O uso de produtos naturais, sejam ele de origem animal, vegetal ou até mesmo mineral para se tratar 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, microorganismos, animais e minerais. Atualmente, nos países industrializados, cerca de 50% dos medicamentos prescritos são derivados ou sintetizados de produtos naturais (11).

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 (45).

Diante deste cenário, estratégias de uso racional dos antifúngicos e busca de novas alternativas terapêuticas se fazem necessárias. Os produtos naturais e seus derivados são reconhecidamente importantes na pesquisa farmacológica. Devido a sua abundância, fácil manuseio e boa capacidade biossintética, estes são uma importante fonte para o desenvolvimento de novas moléculas, de maior eficácia e segurança. Nos últimos anos esses produtos e seus derivados têm sido berço para esses estudos, resultando em novas opções promissoras de tratamento, incluindo antifúngicos (46).

Evidências crescentes mostram o enorme potencial antifúngico de quantidades de drogas de plantas medicinais que são facilmente acessíveis e menos tóxicas para humanos com atividades antifúngicas decentes e preços razoáveis (47). 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 (48).

Devido à crescente evidência de resistência a antimicrobianos e antifúngicos, vários estudos têm sido desenvolvidos visando a identificação e avaliação de alternativas terapêuticas eficientes. Os produtos naturais, em particular os derivados de plantas, têm

sido explorados com esse propósito; o potencial terapêutico dos fitoquímicos, os efeitos sinérgicos entre eles e os mecanismos de ação relacionados foram extensivamente estudados. No entanto, muitos extratos e ou compostos de origem vegetal permanecem desconhecidos e podem constituir um tratamento alternativo ou complementar para a candidíase (49).

No Brasil, o uso de plantas na medicina popular para prevenção e tratamento de diversos distúrbios de saúde é uma prática comum. Entre as plantas populares utilizadas para esse fim está o Sangue de Dragão. Também é usado entre outras formas de tratamentos para doenças como anemia, bronquite e asma (50).

Estudos de diversos autores demonstraram que espécies do gênero *Croton* possuem atividade antimicrobiana contra diversas espécies de bactérias e fungos, além de atividade moduladora de drogas antibacterianas e antifúngicas (51).

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 (52). A sangra d'água é empregada tradicionalmente para vários fins, como antibiótico, analgésico, anti-inflamatório, cicatrizantes, dentre outros (53).

Durante séculos, os residentes indígenas da América do Sul usaram plantas botânicas amazônicas para a cicatrização de feridas e cura de enfermidades. Sangue de Dragão, também conhecido como sangue de grado e sangue de drago, é derivado de *C. lechleri* da família *Euphorbiaceae* (54). Quando cortada, sangra uma seiva vermelha, fornecendo o homônimo "Sangue de Dragão". Os amazonenses usam Sangue de Dragão, fresco ou como pó seco, em remédios para dor de garganta, urticária, câncer, antisséptico vaginal, picadas de insetos, hemostasia, cicatrização de feridas e diarreia (37,38).

Entre os membros da família *Euphorbiaceae*, *Croton* destaca-se como o segundo maior gênero, com mais de 1.300 espécies de árvores, arbustos e ervas, principalmente de áreas tropicais e subtropicais do mundo (56).

C. lechleri pertence à Família *Euphorbiaceae*, apresentando distribuição geográfica pantropical, abrangendo as Américas, África continental, Madagascar e Antilhas; no Brasil é encontrada em vários estados, sendo que a disseminação da espécie ocorre principalmente nos estados do Acre e Rondônia, ao longo das margens do rio

Madeira. A espécie vegetal é encontrada em florestas com planície de inundação, geralmente próximos aos rios, assim como em locais alterados antropomorfizados, como em fragmentos florestais e especialmente em campos de cultivos abandonados (57).

C. lechleri cresce nos territórios da Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, México e Brasil, bem como, na Europa. Apresenta porte arbóreo médio a grande, podendo alcançar até 20 m de altura; seu tronco é geralmente fino no máximo 30 cm de diâmetro, sendo coberto por casca lisa; suas folhas e flores apresentam grande tamanho, sendo levemente aromáticas (58). É utilizada como planta fitoterápica no tratamento de cânceres, apresentando também ação citotóxica, cicatrizante, adstringente, mutagênica e antimutagênica, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e no tratamento de distúrbios gástricos (58).

Sua casca produz um látex viscoso cor de sangue, por este motivo a planta é conhecida como sangue de dragão (59). O látex apresenta compostos fenólicos, incluindo protoantocianidinas, catequinas, epicatequina, galocatequina e epigalocatequinas, alcalóide como taspina e a lignana 3,4-O-dimetilcedrusina (60).

O látex de *C. lechleri* é extraído com pequenos cortes feitos no tronco da árvore. Em algumas regiões do Brasil e do Peru, a árvore vem sendo derrubada como forma de extrativismo predatório. No estímulo de proteção da espécie, no estado do Acre, Brasil, foi criado um manual de colheita do látex sem prejudicar a evolução do vegetal, minimizando os efeitos de estresse (61).

Neste sentido, a seiva obtida da casca das árvores *C. lechleri* é bastante conhecida pelos seus benefícios à saúde e, como tal, é amplamente utilizada na medicina popular devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e cicatrizantes, principalmente devido aos seus principais constituintes químicos, como proantocianidinas (mais de 90% do peso seco da resina), taspina, catequina, epigalocatequina e epicatequina (62).

2.4 Ultrassom

A primeira aplicação do ultrassom terapêutico ocorreu na década de 50, desde então vem evoluindo rapidamente e sendo utilizado em diversas pesquisas, dentre elas,

as que buscam comprovar sua eficácia frente a bactérias e fungos. As ondas ultrassônicas são capazes de gerar resultados terapêuticos, seja por seu efeito térmico ou ação mecânica (63).

O uso terapêutico do ultrassom visa tratar inúmeras doenças, principalmente as de caráter reumatológico e traumato-ortopédico, bem como a consolidação de tecido ósseo e cicatrização de feridas (64). Tal efeito biológico é causado pela energia mecânica gerada pelo equipamento de ultrassom (65).

Os efeitos térmicos são redução de dor, aumento da perfusão, diminuição da rigidez articular, aumento da excitabilidade do colágeno e cicatrização tecidual, tendo-se em vista que o metabolismo aumenta com a elevação da temperatura. O aquecimento de 2° C a 3° C diminui a dor e o espasmo muscular e a rigidez entre as articulações reduz com o aumento de 4° C (66).

Dentre os efeitos não térmicos destacam-se a estimulação e regeneração de tecidos moles e ósseo, aumento do fluxo sanguíneo, vasodilatação e mudanças no metabolismo causados pelas ondas mecânicas (67). Existem dois modos de aplicação das ondas ultrassônicas em terapia, conhecidos como contínuo e pulsado (68).

Quanto maior a frequência, mais superficial será a penetração e, por fim, a duração do tratamento (15), que não pode exceder trinta minutos, para que não provoque queimaduras no paciente e danos ao aparelho. O efeito térmico é produzido pelo ultrassom contínuo, devido à vibração mecânica constante dos tecidos irradiados, ao contrário do modo pulsado, em que a quantidade de calor produzida é pouca, pois a emissão é intermitente prevalecendo assim o efeito puramente mecânico (14).

O ultrassom causa uma série de “efeitos biológicos”, dentre eles a cavitação acústica, em que o crescimento e o colapso de microbolhas em meio líquido gera forças mecânicas como ondas de choque, sendo este um dos mecanismos do efeito antimicrobiano do ultrassom, pois, ao gerar forças de cisalhamento aumenta a captação de antibióticos e antifúngicos, em razão do aumento da permeabilidade da parede celular fúngica, danificando os microrganismos (13,49).

A ultrassonicação é diferente porque os efeitos químicos ocorrem a partir da cavitação acústica. A implosão das bolhas na solução causa um pulso de pressão imediato e alta temperatura na solução. Como resultado desta cavitação acústica, consegue-se uma

intensa micro-mistura local. As vantagens da síntese sonoquímica podem ser atribuídas à taxa da reação química ultrassônica, que é alta devido ao alto número de colisões entre as moléculas dos reagentes (70).

Supõe-se que cavitação estável, cavitação inercial e processos relacionados ao ultrassom, como *microstreaming* acústico e cisalhamento hidrodinâmico, podem causar danos ao citoesqueleto e às membranas celulares. Esses fenômenos também podem aumentar a entrada do sensibilizador aumentando a permeabilização dos tecidos e células-alvo (71).

À medida que a frequência do ultrassom aumenta, os raios oscilatórios das bolhas sob condições de cavitação tornam-se menores; portanto, a frequência ultrassônica pode ditar a dinâmica das bolhas e, conseqüentemente, os resultados sonodinâmicos. Foi demonstrado que a maioria dos sonossensibilizadores responde ao ultrassom com frequência variando de 0,2 a 3 MHz (53, 54).

Assim, o uso do ultrassom em baixa frequência e baixa intensidade *in vitro* associados a fármacos antifúngicos tem-se demonstrado promissor, aumentando significativamente a mortalidade celular da *C. albicans* (15).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito *in vitro* do ultrassom associado ao *C. lechleri* sobre a inibição de *C. albicans*.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar o impacto da utilização do ultrassom na inibição do crescimento de células fúngicas.
- Analisar a atividade antifúngica do ultrassom na frequência de 1 MHz em modo contínuo associado a diferentes concentrações de *C. lechleri* sobre *C. albicans*.

4 MÉTODO

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais do Curso de Medicina Veterinária (LADIA) e Laboratório de Química, da Universidade Federal do Acre (UFAC). O experimento necessitou a distribuição seletiva e criteriosa de atividades por meio de dois ensaios laboratoriais (A e B) realizados em períodos distintos a partir da adaptação da técnica utilizada por Yang et al. (2018), para se verificar a reprodutibilidade. Posteriormente os dados foram agrupados para análise em conjunto para se obter maior número amostral.

Foi previamente selecionada uma cepa padrão de *C. albicans* (AATCC®10231TM). Foram organizados e esterilizados todos os instrumentos e vidrarias, bem como, selecionado todo o material e insumos necessários para a realização do experimento. Nos ensaios laboratoriais foram utilizados meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), caldo Sabouraud Dextrose, Fluconazol 150 mg do (@ LUPIN/MEDQUÍMICA), seiva do Sangue de Dragão (*C. lechleri*) da empresa Encantos da Floresta, Centrífuga SL-700/SOLAB e o aparelho de ultrassom fisioterapêutico modelo Sonomed III da Ibramed, na frequência de 1 MHz e intensidade de 1 W/cm², por 5 minutos, associados ou não ao *C. lechleri* em diferentes concentrações.

Para a preparação do meio de cultura e caldo foram utilizadas as proporções de 65 g e 30 g respectivamente diluído em 1.000 ml de água destilada. Logo após, o clorafenicol foi adicionado ao meio e caldo na proporção de 200mg/L, a fim de evitar proliferação bacteriana.

De acordo com o estudo laboratorial, a seiva do Sangue de Dragão (*C. lechleri*) da empresa Encantos da Floresta utilizada nos ensaios laboratoriais apresentou-se com 86,84 % de umidade, 6,86 mg de matéria seca e 14 g/ml de densidade.

Um recipiente plástico foi adaptado e confeccionado utilizando-se um galão de 5 L a fim de possibilitar o uso do transdutor de ultrassom submerso em água, de acordo com a Figura 1, evitando-se, dessa forma, o aquecimento do ultrassom.



Figura 1: Recipiente plástico adaptado e confeccionado utilizando-se um galão de cinco litros para uso do transdutor de ultrassom submerso em água.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Os dados foram tabulados em planilhas eletrônicas Excel-2021 (Microsoft®) e o tratamento estatístico realizado com a utilização do software livre Jamovi versão 2.3.21. Na sequência, promoveu-se os cálculos dos parâmetros de tendência central: média, desvio padrão e coeficiente de variação, bem como, do valor P de Shapiro-Wilk, índice de inibição relativa, índice de confiabilidade e consistência interna: coeficiente de Pearson, α de Cronbach, ω de McDonald. O índice de inibição relativa de *C. albicans* foi calculado como uma porcentagem da atividade do grupo controle definida como 100%.

Os parâmetros de tendência central foram expressos por meio de tabelas e diagramas de caixa, de acordo com os oito grupos distintos: controle negativo, controle positivo (Fluconazol), tratamento apenas com ultrassom (UST), tratamento apenas com *C. lechleri* 100 μ L (C1100) e com *C. lechleri* 150 μ L (C1150), tratamento com ultrassom associado ao Fluconazol (UST+FLU) e tratamento com ultrassom associado a concentrações de 100 μ L e 150 μ L de *C. lechleri*, (UST+C1100) e (UST+C1150), respectivamente.

Em todos os grupos de trabalho foram realizadas triplicatas com os resultados das médias da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), bem como, da área percentual ocupada, do tamanho médio e área total. Na sequência, foi realizado o processamento digital e análise das imagens por meio do *software* livre ImageJ.

4.1 Técnica de semeadura por esgotamento

Utilizou-se a cepa padrão de *C. albicans* previamente selecionada para a realização do cultivo, através da técnica de semeadura por esgotamento em meio de cultura ASD. Com o auxílio da alça bacteriológica de platina, foram estriadas cepas em duas placas de Petri e incubadas por 24 h a 37° C, de acordo com a Figura 2.

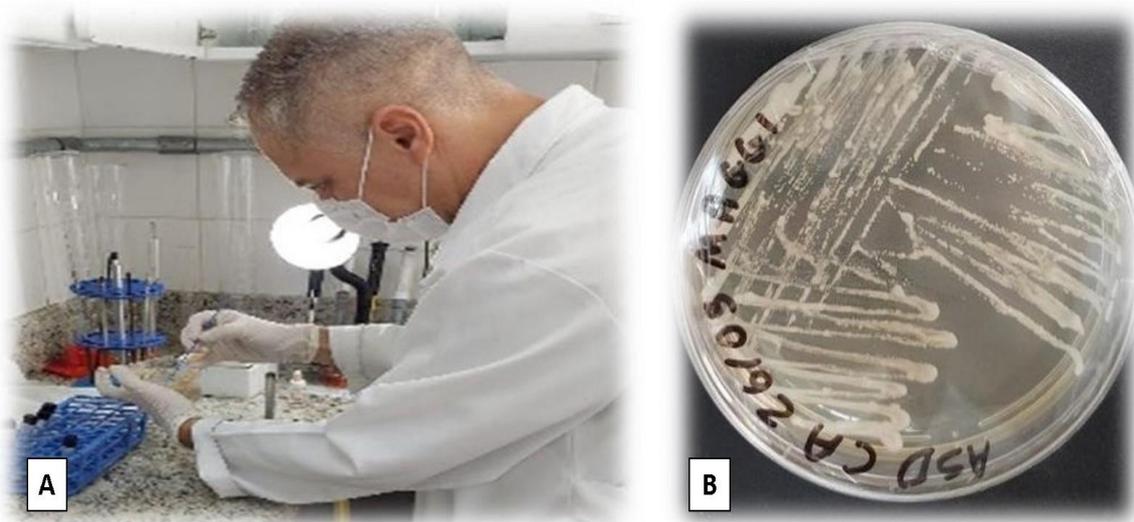


Figura 2: A- Técnica de semeadura por esgotamento. B- Crescimento fúngico após incubação por 24 h a 37° C.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

4.2 Inoculação em meio líquido

Após a observação do crescimento fúngico, com o auxílio da alça bacteriológica descartável, foram inoculadas duas colônias de *C. albicans* em 100 ml de Caldo Sabouraud Dextrose e incubadas por 24 h a 37° C, de acordo com a Figura 3.



Figura 3: Inoculação de duas colônias em 100 ml de caldo Sabouraud Dextrose por 24 h a 37° C.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

4.3 Centrifugação das suspensões fúngicas

Foram preparadas suspensões fúngicas padronizadas na escala 0,5 Mc Farland equivalente à $1,5 \times 10^8$ células/mL distribuídas em tubos de ensaio de 15 ml, de acordo com a Figura 4.



Figura 4: Preparação das suspensões fúngicas na escala 0,5 Mc Farland.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Uma alíquota de 1 ml desta suspensão foi colocada em 24 tubos falcon de plástico de 15 ml e centrifugadas a 3.600 rpm por 15 minutos, de acordo com a Figura 5.



Figura 5: Centrifugação das suspensões fúngicas a 3.600 rpm por 15 minutos.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Foram preparados quatro caldos distintos de 100 ml, viabilizando desta forma a próxima etapa do ensaio laboratorial (transferência das suspensões fúngicas), de acordo com a Figura 6. O primeiro caldo apresentou-se puro, sem adição nenhuma. O segundo caldo com a adição de Fluconazol, na proporção de 0,0012 g para 100 ml. A concentração de Fluconazol utilizada no presente estudo seguiu a concentração Inibitória Mínima capaz de inibir em 50% (CIM50) o crescimento de *C. albicans*, quando comparada com o crescimento sem antifúngico que, de acordo com Cunha et al. (2016), é de 12 µg/ml. O terceiro e o quarto caldos foram preparados com a adição de *C. lechleri* nas concentrações de 100 µL e 150 µL respectivamente.



Figura 6: Preparação e acondicionamento de quatro caldos distintos.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

4.4 Transferência das suspensões fúngicas

Na sequência, foi desprezado o sobrenadante dos 24 tubos falcon submetidos à centrifugação e o pellet de células foi ressuspensado em 1 ml de solução salina fisiológica.

As suspensões fúngicas ressuspensas foram transferidas para as placas de acrílico, de acordo com os grupos do experimento. São eles: placas (caldo puro), placas (caldo com Fluconazol) e placas (caldo com *C. lechleri* 100 µL) e placas (caldo com *C. lechleri* 150 µL), de acordo com a Figura 7. As placas de acrílico utilizadas são de 60 mm de diâmetro por 15 mm de altura.

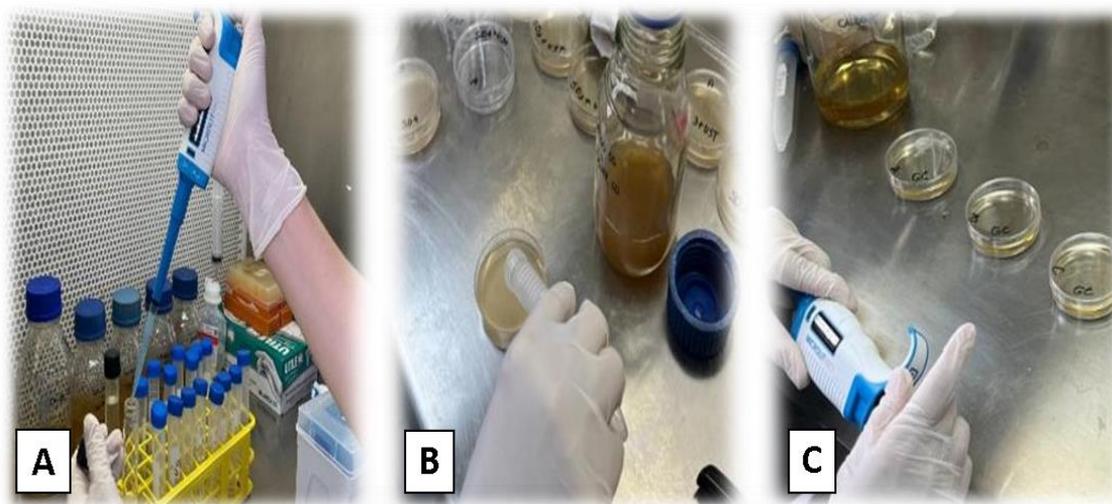


Figura 7: A- Ressuspensão fúngica em 1 ml de solução salina fisiológica. B e C- Transferência das ressuspensões fúngicas para as placas de acrílico.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

4.5 Exposição das suspensões ao Ultrassom

Na sequência, as triplicatas de cada grupo foram submetidas ao tratamento com ultrassom, com exceção dos grupos controle, Fluconazol, *C. lechleri* 100 µL e *C. lechleri* 150 µL. Quatro grupos foram tratados com ultrassom: UST, UST+FLU, UST+*C. lechleri* 100 µL e UST+*C. lechleri* 150 µL de acordo com a Figura 8.

O grupo controle foi mantido sem qualquer tratamento: Fluconazol, *C. lechleri* ou ultrassom. Já os grupos experimentos, os tratamentos ocorreram com a adição de

Fluconazol ou *C. lechleri*, bem como, associados ou não à exposição ultrassônica de 1 W/cm² com frequência de 1 MHz, em modo contínuo, por 5 minutos.



Figura 8: Exposição das suspensões fúngicas dos grupos UST, UST+FLU, UST+*C. lechleri* 100 µL e UST+*C. lechleri* 150 µL ao Ultrassom.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

4.6 Ensaio de viabilidade celular

Logo após o tratamento com ultrassom, foram retirados 100 µL de cada inóculo das placas Petri de acrílico e imediatamente semeadas, pela técnica de gotejamento, e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski, em meio ASD e incubadas por 24 h a 37° C, a fim de determinar as UFC de acordo com a Figura 9.

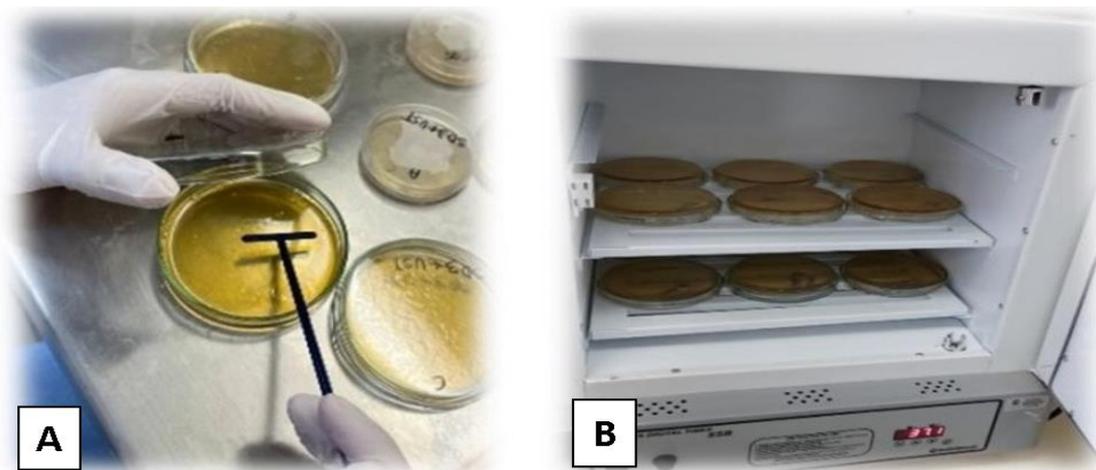


Figura 9: A- Semeadura pela técnica de esgotamento e espalhamento com o auxílio de uma alça de Drigalski em placas com meio ASD. B- Placas de Petri incubadas por 24 h a 37° C.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

4.7 Análise automatizada ImageJ

No último dia do experimento, o registro fotográfico das placas de todos os grupos foi realizado por meio de telefone celular, com o objetivo de avaliar a inibição do crescimento de UFC de *C. albicans*. Na sequência, promoveu-se o processamento digital e a análise das imagens por meio do *software* livre ImageJ, através de comandos em quatro etapas: 1) Pré-processamento, 2) Formatação, 3) Binarização e 4) Processamento. As funções disponibilizadas no *Menu* inicial, de acordo com a Figura 10, oportunizaram o processamento da contagem automatizada de UFC, bem como, o cálculo da área percentual ocupada, tamanho médio e área total de cada registro fotográfico.

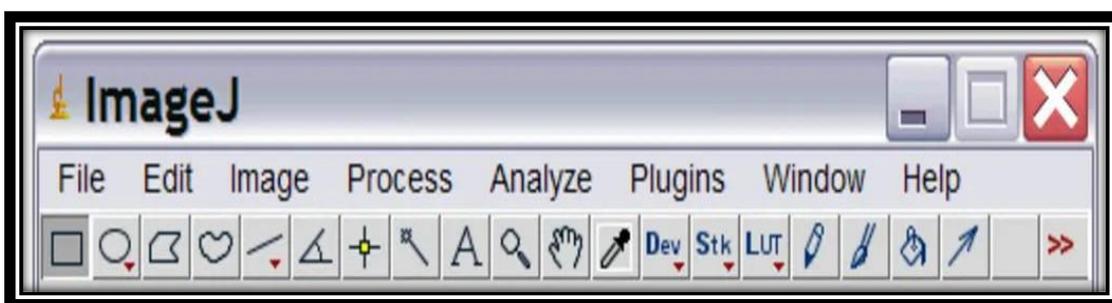


Figura 10: Funções disponíveis no *Menu* inicial do *software* ImageJ.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Segue a descrição detalhada dos comandos utilizados ao longo das etapas do processamento e análise das imagens automatizadas pelo Image J.

1) Pré-processamento:

a) Clique em *FILE* ou *CTRL+O* e selecione um arquivo de imagem no formato JPG de acordo com a Figura 11.

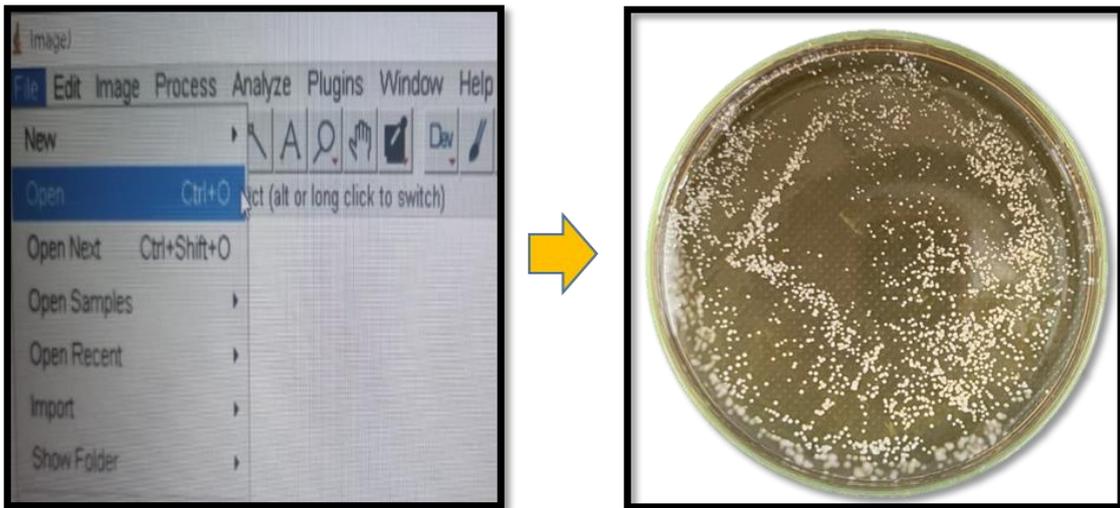


Figura 11: A- Menu File/Open (Ctrl+O). B- Seleção de um arquivo de imagem no formato JPG

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

- b) Selecione a ferramenta *Elliptical* para delimitar circularmente a área que o programa deverá reconhecer.
- c) Clique em *EDIT*, clique em *CLEAR OUTSIDE* para subtrair a imagem externa ao círculo, limitando a área de análise somente ao círculo. A área externa ao círculo deverá ficar preta de acordo com a Figura 12.

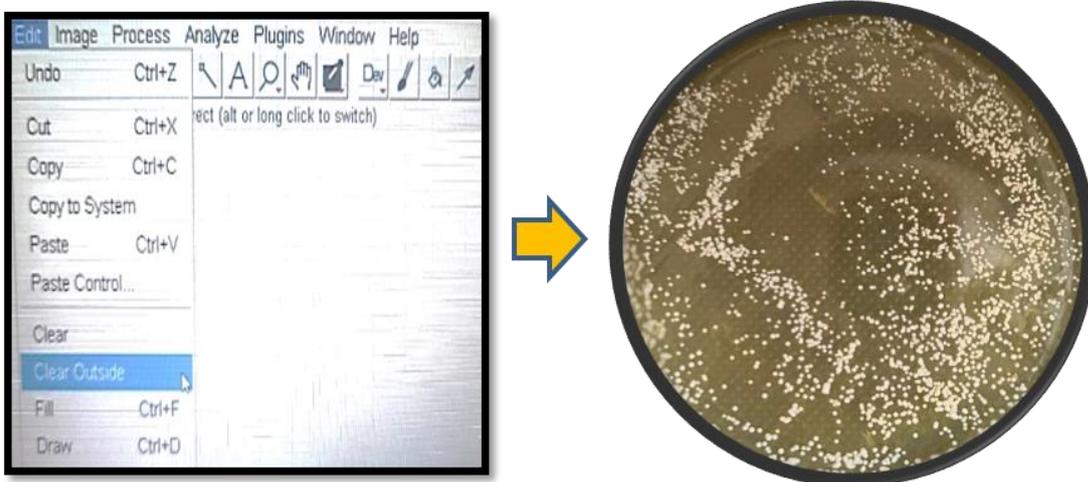


Figura 12: Menu Edit/Clear outside.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

2) Formatação:

- a) Clique em *IMAGE*, depois em *TYPE* e *8-Bit*, objetivando a configuração da imagem através da conversão para escala com 256 tons de cinza de acordo com a Figura 13.

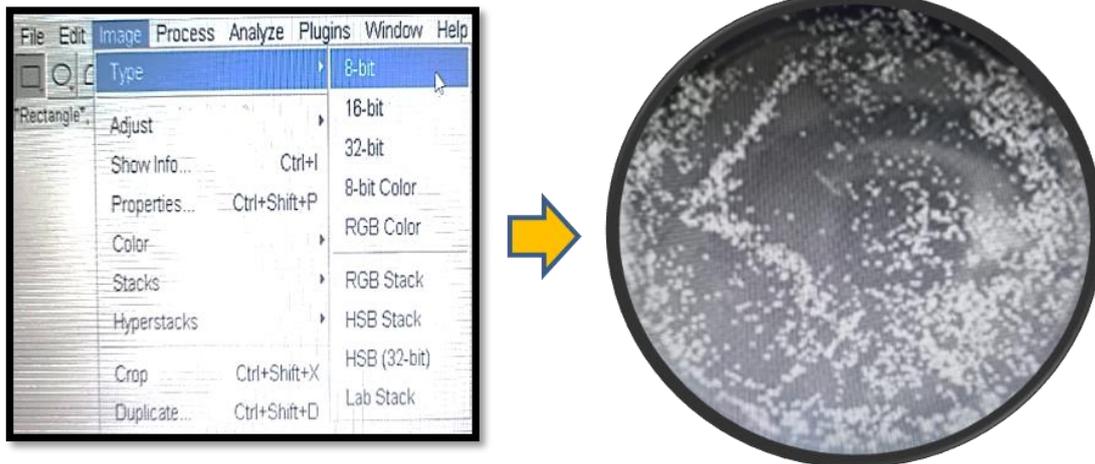


Figura 13: Menu ImageJ/Type/8 bits.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

3) Binarização:

a) Clique em *IMAGE*, depois em *ADJUST* e *THRESHOLD* para permitir o ajuste dos níveis, ou seja, determinar o limite de contraste branco e preto utilizando a barra de rolagem de acordo com a Figura 14.

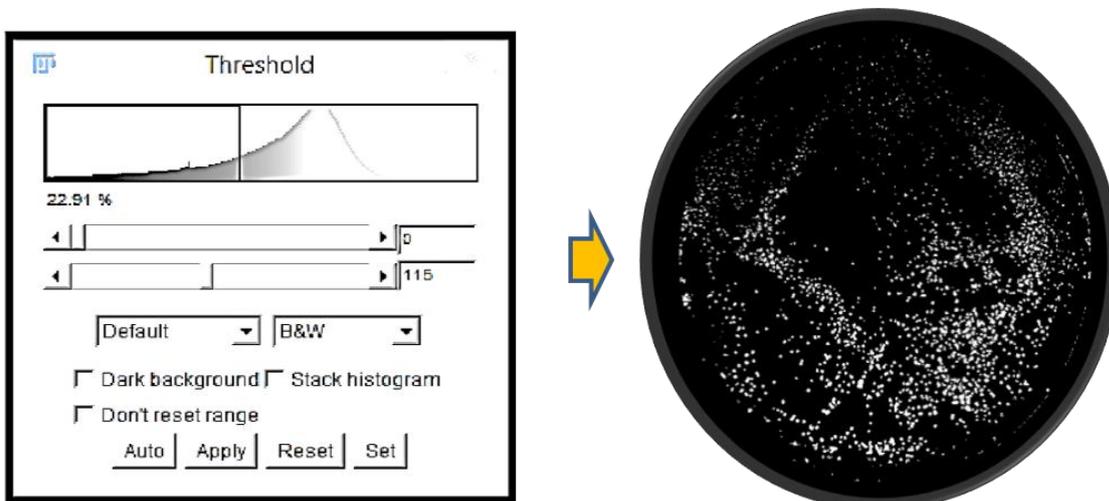


Figura 14: Menu Image/Adjust/Threshold.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

- a) Na janela aberta selecione a opção *B&W* (imagem em preto e branco) e aplique através do comando *Apply*.
- b) Selecione novamente a ferramenta *Elliptical* para delimitação da área trabalhada.

- c) Clique em *PROCESS*, depois *BINARY* e *WATERSHED* para promover a separação e numeração das UFC que se comunicam entre si de acordo com a Figura 15.

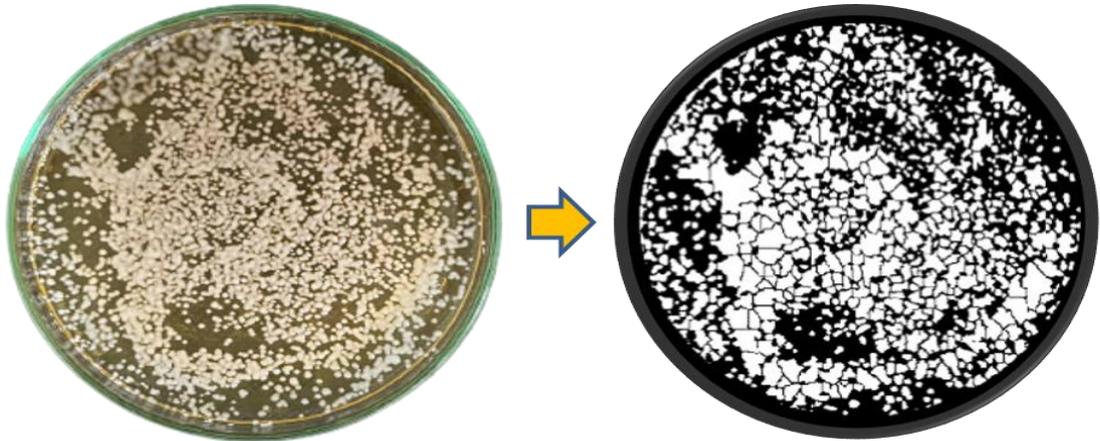


Figura 15: Menu Process/Binary/Watershed.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

4) Processamento:

- a) Clique em *ANALYSE*, depois em *ANALYSE PARTICLES*. Na janela de diálogo aberta selecione os comandos abaixo a fim de refinar e disponibilizar os resultados da análise de partículas: *Display results*, *exclude on edges*, *size*, *circularity*, *show*, *outlines* e *summary*, de acordo com a Figura 16.

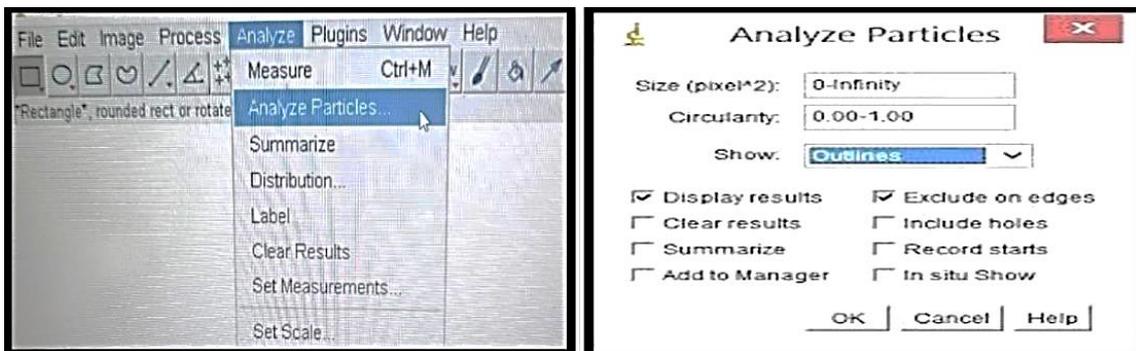


Figura 16: Menu Analyse/Analyse particles.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaios laboratoriais A e B

As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados do efeito antifúngico do ultrassom associado ao *C. lechleri* por meio da contagem automatizada de UFC e área percentual dos ensaios A e B, permitindo a análise dos parâmetros de tendência central: média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

A Tabela 1 apresenta os resultados dos parâmetros de tendência central dos ensaios A e B consoantes a UFC dos grupos.

Tabela 1: Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) das UFC dos ensaios A e B.

| GRUPOS | UFC | | | |
|--------------|-----------|--------|-----------|--------|
| | A | | B | |
| | Média±DP | CV | Média±DP | CV |
| CONT | 1.089±177 | 16,25% | 1.218±332 | 27,25% |
| FLU | 939±100 | 10,64% | 947±584 | 61,66% |
| CI 100 | 365±57,5 | 15,75% | 354±170 | 48,02% |
| CI 150 | 525±78,9 | 15,02% | 790±359 | 45,44% |
| UST | 454±41,6 | 9,16% | 262±132 | 50,38% |
| UST + FLU | 494±26,7 | 5,40% | 323±49,8 | 15,41% |
| UST + CI 100 | 251±50,4 | 20,07% | 197±9,45 | 4,79% |
| UST + CI 150 | 476±194 | 40,75% | 549±91,5 | 16,66% |

* Controle (CONT), Fluconazol (FLU), *C. lechleri* 100 µL (CI100), *C. lechleri* 150 µL (CI150), UST (UST), UST+FLUCONAZOL (UST+FLU), UST+*C. lechleri* 100 µL (UST+CI100), UST+*C. lechleri* 150 µL (UST+CI150).

Comparando-se os ensaios laboratoriais, observa-se o aumento da média de UFC em três grupos: CONT, CI150 e UST+CI150, com destaque para os grupos CONT (1.089 para 1.218) e CI150 (525 para 790). Em contrapartida, nota-se a redução da média nos grupos: UST, UST+FLU e UST+CI100, com destaque para os grupos UST (454 para 262) e UST+FLU (494 para 323). Os grupos CI100 e FLU mantiveram as médias aproximadas nos ensaios A e B, com valores de (365 para 354) e (939 para 947), respectivamente.

Dentre os resultados mais significativos estão presentes os grupos: UST+CI100, CI100, UST, UST+FLU e UST+CI150. O grupo UST+CI100 apresentou os resultados mais significativo de UFC (251 e 197), respectivamente aos ensaios A e B.

No tocante ao DP, observa-se no ensaio B o aumento em seis grupos e redução somente nos grupos UST+CI100 e UST+CI150. A heterogeneidade do ensaio B explica-

se pela presença de quatro grupos com CV alto, isto é, acima de 30%. Dentre eles: UST (50,38%), CI 100 (48,02%), CI 150 (45,44%) e FLU (61,66%) que a exemplo apresentou uma de suas placas com 274 UFC, destoando dos demais resultados (1.243 e 1.324).

O ensaio A apresentou resultados mais homogêneos, ou seja, com menor dispersão relativa em relação à média, visto que a média sofreu menor influência dos valores extremos.

A Tabela 2 apresenta os resultados dos parâmetros de tendência central dos ensaios A e B consoantes a área percentual dos grupos.

Tabela 2: Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) das áreas percentuais dos ensaios A e B.

| GRUPOS | ÁREA (%) | | | |
|---------------------|-----------|--------|-----------|--------|
| | A | | B | |
| | Média±DP | CV | Média±DP | CV |
| CONT | 39,9±4,45 | 11,15% | 44,7±15,8 | 35,34% |
| FLU | 34,8±5,53 | 15,89% | 23,4±15,6 | 66,66% |
| CI 100 | 4,32±0,92 | 21,29% | 2,88±1,78 | 61,80% |
| CI 150 | 8,0±1,76 | 22,0% | 10,4±3,85 | 37,01% |
| UST | 3,42±0,26 | 7,60% | 1,8±0,05 | 2,77% |
| UST + FLU | 3,98±0,66 | 16,58% | 2,01±0,19 | 9,45% |
| UST + CI 100 | 2,53±0,27 | 10,67% | 1,42±0,27 | 19,01% |
| UST + CI 150 | 4,81±1,44 | 29,93% | 6,09±1,66 | 27,25% |

* Controle (CONT), Fluconazol (FLU), *C. lechleri* 100 µL (CI100), *C. lechleri* 150 µL (CI150), UST (UST), UST+FLUCONAZOL (UST+FLU), UST+*C. lechleri* 100 µL (UST+CI100), UST+*C. lechleri* 150 µL (UST+CI150).

Comparando-se os ensaios laboratoriais, observa-se aumento da média de área percentual em três grupos: CONT, CI150 e UST+CI150. Tais grupos são coincidentes quanto ao aumento de UFC verificado na Tabela 1.

O ensaio B mostra-se mais heterogêneo, com áreas variando de 1,42% a 44,7%, diferentemente do ensaio A com variações de 2,53% a 39,9%. Na mesma linha de raciocínio, observam-se os valores de CV aumentados em cinco grupos do ensaio B. A maior heterogeneidade do ensaio B explica-se pela presença de quatro grupos com CV alto. Dentre eles: CI 100 (61,80%), CI 150 (37,01%), CONT (35,34%) e FLU (66,66%) que a exemplo apresentou uma de suas placas com 5,47% de área ocupada destoando dos demais resultados com 34,16% e 30,64%.

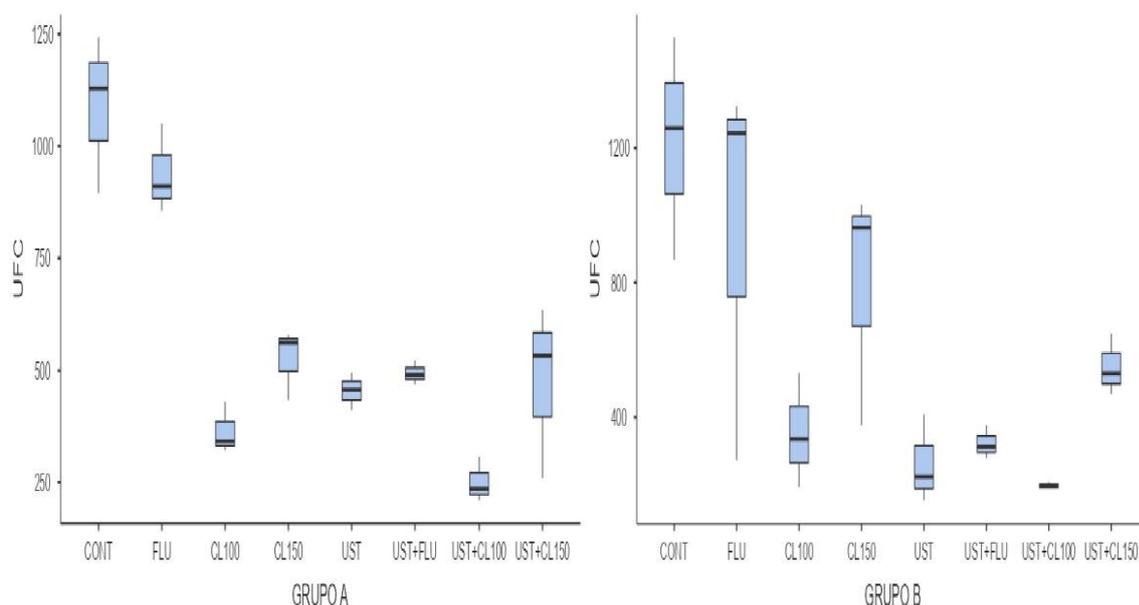
Quanto à análise da dispersão absoluta (DP), observa-se que a média sofreu pouca influência dos valores extremos do grupo UST+CI100 (0,27% nos 2 ensaios), bem como, dos grupos UST (0,26% no ensaio A e 0,05% no ensaio B) e UST+FLU (0,66% em A e 0,19% em B).

Corroborando com os resultados da Tabela 1, o ensaio A mostrou-se mais homogêneo. Mais uma vez, o grupo UST+CI100 destacou-se com o melhor resultado: 2,53% e 1,42%, respectivamente aos ensaios A e B.

De acordo com as Figuras 17 e 18, observa-se a dispersão representada pelos intervalos interquartis dos ensaios A e B, bem como, evidencia os resultados mais significativos de UFC e área percentual associados aos grupos: UST+CI100, CI100, UST, UST+CI150 e UST+FLU.

A figura 17 destaca a média de UFC, bem como, os intervalos de cada grupo, evidenciando a presença de valores discrepantes no ensaio A: 895 (CONT), 260 (UST+CI150) e no ensaio B: 274 (FLU), 1.527 e 867 (CONT) e 377 (CI150). Observam-se o maior e menor valor de UFC associados aos grupos CONT (1.527) e UST (153) do ensaio B.

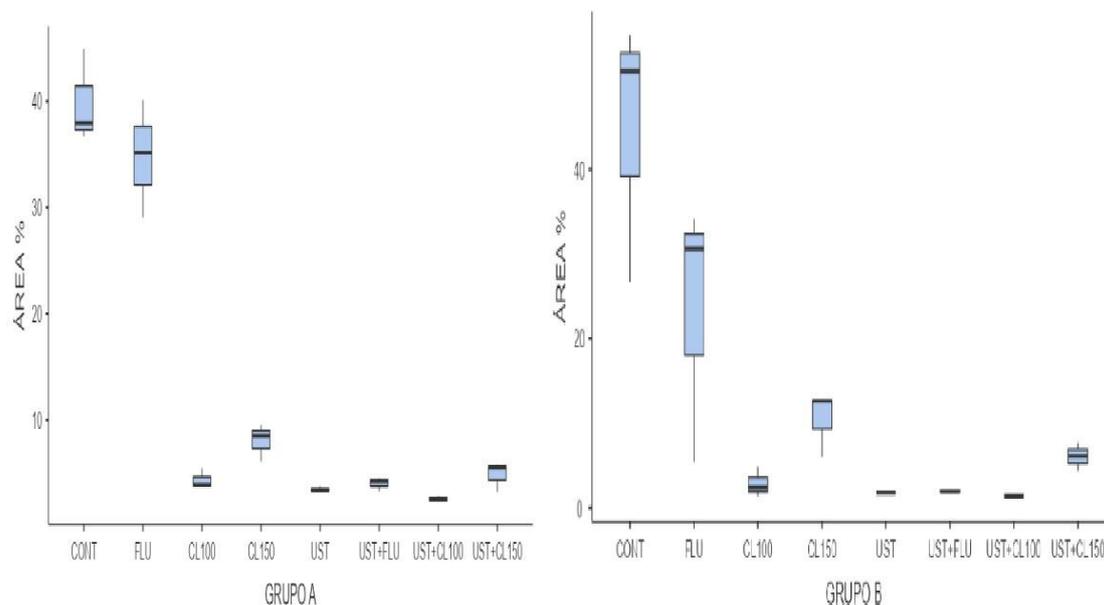
Figura 17: Valor médio das UFC de *C. albicans* submetidas aos tratamentos com *C. lechleri* associados ou não ao ultrassom nas concentrações de 100 e 150 μL na frequência de 1 MHz e intensidade de 1 W/cm^2 por 5 minutos de exposição.



* Controle (CONT), Fluconazol (FLU), *C. lechleri* 100 μL (Cl100), *C. lechleri* 150 μL (Cl150), UST (UST), UST+FLUCONAZOL (UST+FLU), UST+*C. lechleri* 100 μL (UST+Cl100), UST+*C. lechleri* 150 μL (UST+Cl150).

A figura 18 destaca a média de área percentual e intervalos de cada grupo, bem como, confirma a maior homogeneidade do ensaio A. Destaca os resultados mais significativos: 2,53% e 1,42%, relacionados ao grupo UST+Cl100, respectivamente aos ensaios A e B, bem como, evidencia a presença de valores discrepantes no ensaio B: 5,47% (FLU), 26,70% (CONT) e 6% (Cl150). Observamos o maior e menor valor de área percentual associados aos grupos CONT (55,92%) e UST+Cl100 (1,13%) do ensaio B.

Figura 18: Valor médio da área infectada por *C. albicans*, submetidas aos tratamentos com *C. lechleri* associados ou não ao ultrassom nas concentrações de 100 e 150 µL na frequência de 1 MHz e intensidade de 1 W/cm² por 5 minutos de exposição.



Controle (CONT), Fluconazol (FLU), *C. lechleri* 100 µL (CI100), *C. lechleri* 150 µL (CI150), UST (UST), UST+FLUCONAZOL (UST+FLU), UST+*C. lechleri* 100 µL (UST+CI100), UST+*C. lechleri* 150 µL (UST+CI150).

Diferentemente dos programas de contagem manual de UFC, o *software* ImageJ, desenvolvido em linguagem Java, permite o processamento das imagens, melhorando a qualidade e viabilizando a contagem automatizada de placas com crescimento excessivo, bem como, permite a análise da inibição de *C. albicans* consoante ao tamanho médio e área total de UFC dos ensaios A e B de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3: Tamanho médio e área total das UFC dos ensaios A e B.

| GRUPOS | TAMANHO MÉDIO UFC | | ÁREA TOTAL UFC | |
|---------------------|-------------------|--------------|----------------|--------|
| | A | B | A | B |
| CONT | 71,5 | 67,02 | 76.582 | 83.849 |
| FLU | 91,46 | 52,03 | 86.075 | 47.140 |
| CI 100 | 18,74 | 27,41 | 6.969 | 13.908 |
| CI 150 | 32,27 | 33,18 | 16.538 | 26.207 |
| UST | 24,01 | 25,54 | 10.922 | 5.690 |
| UST + FLU | 32,23 | 24,33 | 15.845 | 7.612 |
| UST + CI 100 | 27,03 | 21,30 | 6.693 | 4.248 |
| UST + CI 150 | 17,48 | 32,67 | 6.765 | 18.122 |

* Controle (CONT), Fluconazol (FLU), *C. lechleri* 100 µL (CI100), *C. lechleri* 150 µL (CI150), UST (UST), UST+FLUCONAZOL (UST+FLU), UST+*C. lechleri* 100 µL (UST+CI100), UST+*C. lechleri* 150 µL (UST+CI150).

Quanto ao tamanho médio de UFC, o grupo UST+C1100 obteve resultados significativos, respectivamente aos ensaios A (27,03) e B (21,30). Quanto a área total, o grupo UST+C1100 obteve os resultados mais significativos, 6.693 e 4.248, quando comparados aos resultados menos significativos, FLU (86.075) e CONT (83.849), respectivamente aos ensaios A e B.

É nítida a inibição do crescimento de *C. albicans*, traduzido pela diminuição do tamanho médio de UFC e área total dos grupos que receberam tratamento do ultrassom associados ou não ao *C. lechleri*.

De acordo com as Figuras 19 e 20, é possível comparar visualmente o efeito antifúngico do ultrassom associado ao *C. lechleri* comparados ao grupo controle, a partir da contagem de UFC e cálculo de área percentual em duas placas selecionadas dos grupos: controle, C1100, UST, UST+FLU, UST+C1100 e UST+C1150.

| GRUPO | IMAGEM (UFC/ÁREA%) | |
|-----------|--|---|
| CONTROLE |  1.129 / 36,70% |  1.527 / 51,59% |
| CI 100 µL |  335 / 2,40% |  342 / 3,84% |
| UST |  411 / 3,22% |  408 / 1,85% |

Figura 19: Placas com registro de UFC e área percentual ocupada por colônias formadoras de *C. albicans* dos grupos controle, *C. lechleri* 100 µLe UST.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

| GRUPO | IMAGEM (UFC/ÁREA %) | |
|------------------------|--|---|
| UST + FLU |  <p data-bbox="587 741 740 779">490 / 4,19%</p> |  <p data-bbox="1034 741 1187 779">313 / 2,22%</p> |
| UST + <i>Cl</i> 100 µL |  <p data-bbox="587 1256 740 1294">210 / 2,28%</p> |  <p data-bbox="1034 1256 1187 1294">194 / 1,44%</p> |
| UST + <i>Cl</i> 150 µL |  <p data-bbox="587 1744 740 1783">530 / 6,12%</p> |  <p data-bbox="1034 1744 1187 1783">469 / 4,41%</p> |

Figura 20: Placas com registro de UFC e área percentual ocupada por colônias formadoras de *C. albicans* dos grupos UST+FLU, UST+*C. lechleri* 100 µL e UST+*C. lechleri* 150 µL.

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

A Tabela 4 apresenta os índices de confiabilidade e consistência interna através dos coeficientes de Pearson, α de Cronbach e ω de McDonald, de acordo com a correlação entre as variáveis UFC e área percentual ocupada quando comparados os ensaios A e B.

Tabela 4: Análise da reprodutibilidade. Coeficiente de Pearson, α de Cronbach e ω de McDonald das UFC e área percentual ocupada.

| VARIÁVEIS DOS ENSAIOS A e B | Coeficiente de Pearson | α de Cronbach | ω de McDonald |
|-----------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| UFC | 0,77 | 0,85 | 0,87 |
| ÁREA % | 0,89 | 0,93 | 0,94 |

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Os índices da Tabela 4 evidenciam bons parâmetros de reprodutibilidade dos ensaios A e B, demonstrando grau de correlação quanto a concordância entre as variáveis.

O coeficiente de Pearson possui intervalo que varia de - 1 a + 1. Quando o coeficiente é igual a 1, considera-se perfeito positivo, entre 0,75 e 0,90 considera-se alta confiabilidade e acima de 0,90 considera-se a confiabilidade muita alta.

A correlação de Pearson apresentou alta confiabilidade, quanto à correlação de UFC (0,77) e área percentual (0,89). A confiabilidade relacionada à área percentual mostra-se 0,12 mais significativa do que em relação a UFC.

Em relação aos índices de α de Cronbach e ω de McDonald, verificam-se intervalos de valores entre 0,85 e 0,94. Os resultados relacionados a área percentual, bem como, os valores de ω McDonald mostram-se mais representativos.

Não obstante, a mensuração positiva da consistência e concordância dos ensaios gera resposta e direcionamento quanto a capacidade e a precisão do método utilizado, bem como, permite a análise do experimento geral.

5.2 Experimento geral

Após a tabulação dos dados, a fim de confirmar se os resultados se encaixam em uma análise de distribuição Gaussiana de normalidade, foi realizada uma análise de normalidade, com o teste de Shapiro-Wilk, obtendo resultados positivos para o teste de normalidade para todos os grupos do experimento.

As Tabelas 5 e 6 apresentam os resultados dos parâmetros de tendência central: média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valor P de Shapiro-Wilk e índice de inibição relativa consoante a UFC e área percentual de colônias formadoras de *C. albicans* consoante ao experimento geral.

Na Tabela 5, as médias de UFC apresentam-se entre 1.153 (CONT) e 224 (UST+CI100), representando os extremos dos resultados. Dentre os resultados mais significativos estão os grupos: UST+CI100 (224), UST (358), CI100 (359), UST+FLU (408) e UST+CI150 (513).

Quanto à dispersão relativa, observam-se nas Tabelas 5 e 6, o coeficiente de variação de UFC entre 41,70% (CI 150) e 19,46% (UST+CI100) e de área percentual entre 41,92% (FLU) e 25,29% (CONT), respectivamente.

Tabela 5: Média, desvio padrão, coeficiente de variação, valor P e índice de inibição relativa das UFC do experimento, submetidos a tratamento com *C. lechleri* associados ou não ao ultrassom com frequência de 1 MHz e intensidade de 1 W/cm², no tempo de 5 minutos.

| GRUPOS | | UFC | | Shapiro-Wilk Valor-P | Inibição relativa |
|--|---------------|-----------|--------|-------------------------|----------------------|
| | | Média±DP | CV | | |
| CONT | | 1.153±248 | 21,50% | 0,617 | ----- |
| FLU | | 943±375 | 39,76% | 0,384 | 18,21% |
| UST | | 358±137 | 38,26% | 0,216 | 68,95% |
| UST+FLU | | 408±100 | 24,50% | 0,471 | 64,61% |
| <i>Croton lechleri</i> | 100 µL | 359±114 | 31,75% | 0,793 | 68,86% |
| | 150 µL | 657±274 | 41,70% | 0,200 | 43,02% |
| UST + <i>Croton lechleri</i> | UST+CL 100 µL | 224±43,6 | 19,46% | 0,051 | 80,53% |
| | UST+CL 150 µL | 513±141 | 27,48% | 0,278 | 55,51% |

* Controle (CONT), Fluconazol (FLU), *C. lechleri* 100 µL (CI100), *C. lechleri* 150 µL (CI150), UST (UST), UST+FLUCONAZOL (UST+FLU), UST+*C. lechleri* 100 µL (UST+CI100 µL), UST+*C. lechleri* 150 µL (UST+CI150 µL).

Observa-se na Tabela 6, as médias de área percentual entre 42,30% (CONT) e 1,97% (UST+CI100), representando os extremos dos resultados. Esta variação de 40,33% representa expressiva inibição do crescimento de *C. albicans* dos grupos tratados com ultrassom associados ao *C. lechleri*, de acordo com os cinco resultados mais significativos: UST+CI100 (1,97%), UST (2,61%), UST+FLU (3%), CI 100 (3,60%) e UST+CI150 (5,45%).

As Tabelas 5 e 6 evidenciam o resultado mais significativo do grupo UST+CI100 com médias de UFC (224), área (1,97%) e índice de inibição relativa de 80,53% e 95,34%, relacionados a UFC e área respectivamente. O índice de inibição relativa mostra em seus resultados valores máximo e mínimo de 80,53% (UST+CI100) e 18,21% (FLU) relacionados a UFC e 95,34% (UST+CI100) e 31,22% (FLU) relacionados a área percentual.

Tabela 6: Média, desvio padrão, coeficiente de variação, valor P e índice de inibição relativa da área percentual de colônias formadoras de *C. albicans* do experimento, submetidos a tratamento com *C. lechleri* associados ou não ao ultrassom com frequência de 1 MHz e intensidade de 1 W/cm², no tempo de 5 minutos.

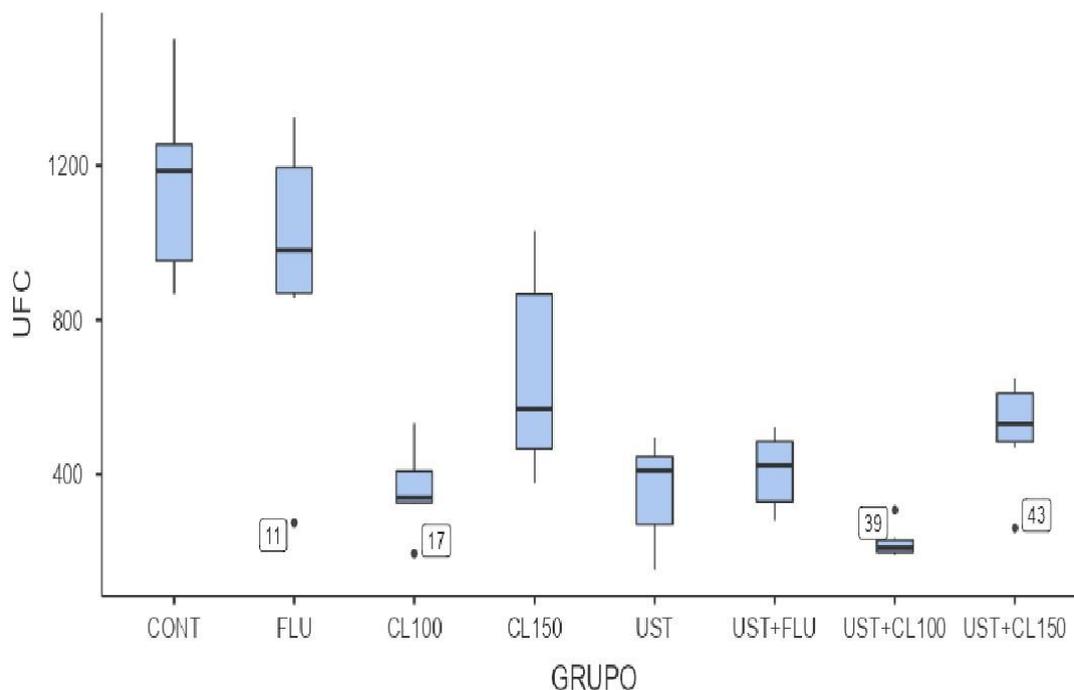
| GRUPOS | | Área % | | Shapiro-Wilk Valor-P | Inibição relativa |
|------------------------------------|---------------|------------|--------|-------------------------|----------------------|
| | | Média±DP | CV | | |
| CONT | | 42,3±10,7 | 25,29% | 0,904 | ----- |
| FLU | | 29,1 ±12,2 | 41,92% | 0,051 | 31,22% |
| UST | | 2,61±0,90 | 34,55% | 0,067 | 93,82% |
| UST+FLU | | 3,0±1,17 | 39,0% | 0,246 | 92,90% |
| <i>Croton lechleri</i> | 100 µL | 3,60±1,49 | 41,38% | 0,793 | 91,48% |
| | 150 µL | 9,22±2,99 | 32,42% | 0,223 | 78,20% |
| UST + <i>Croton lechleri</i> | UST+CL 100 µL | 1,97±0,65 | 32,99% | 0,782 | 95,34% |
| | UST+CL 150 µL | 5,45±1,55 | 28,44% | 0,959 | 87,11% |

* Controle (CONT), Fluconazol (FLU), *C. lechleri* 100 µL (CI100), *C. lechleri* 150 µL (CI150), UST (UST), UST+FLUCONAZOL (UST+FLU), UST+*C. lechleri* 100 µL (UST+CI100 µL), UST+*C. lechleri* 150 µL (UST+CI150 µL).

As Tabelas 5 e 6 evidenciam o resultado mais significativo do grupo UST+CI100 com médias de UFC (224), área (1,97%) e índice de inibição relativa de 80,53% e 95,34%, relacionados a UFC e área respectivamente. O índice de inibição relativa mostra em seus resultados valores máximo e mínimo de 80,53% (UST+CI100) e 18,21% (FLU) relacionados a UFC e 95,34% (UST+CI100) e 31,22% (FLU) relacionados a área percentual.

As Figuras 21 e 22 reproduzem os resultados obtidos dos ensaios A e B, bem como, destacam os valores discrepantes já mencionados anteriormente. A distribuição dos valores de tendência central, bem como, a dispersão representada pelos intervalos interquartis confirma a confiabilidade e consistência interna entre os ensaios.

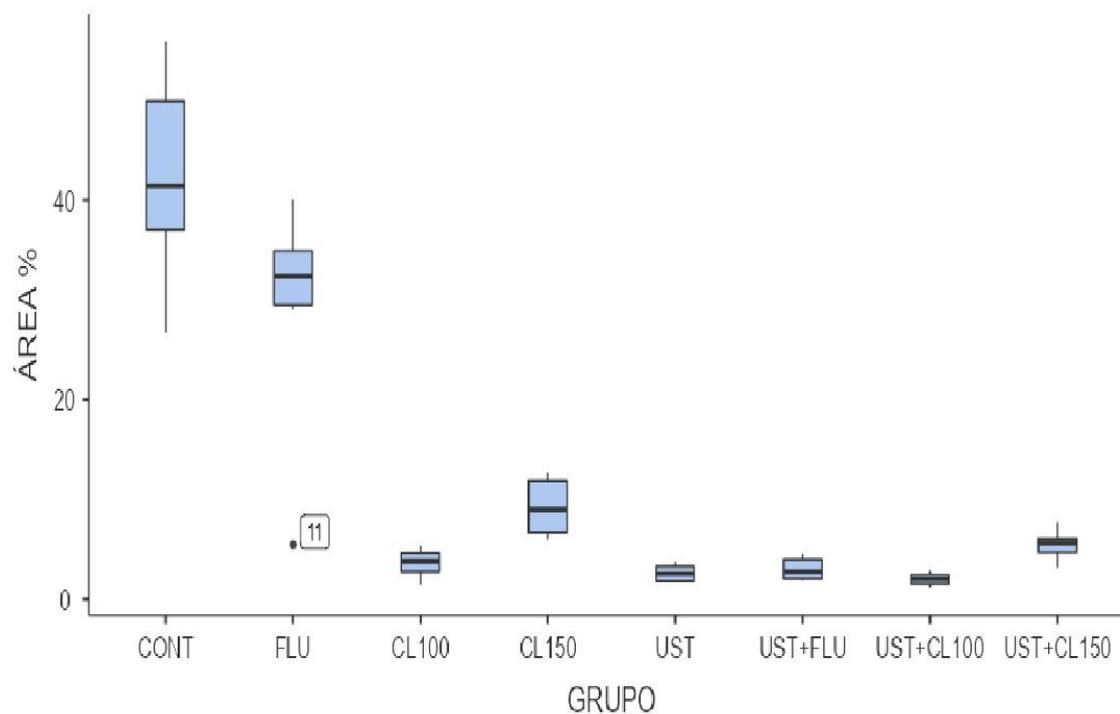
Figura 21: Valor médio das UFC de *C. albicans* submetidas aos tratamentos com *C. lechleri* associados ou não ao ultrassom nas concentrações de 100 e 150 µL na frequência de 1 MHz e intensidade de 1 W/cm² no tempo de 5 minutos de exposição.



* Controle (CONT), Fluconazol (FLU), *C. lechleri* 100 µL (CL100), *C. lechleri* 150 µL (CL150), UST (UST), UST+FLUCONAZOL (UST+FLU), UST+*C. lechleri* 100 µL (UST+CL100), UST+*C. lechleri* 150 µL (UST+CL150).

A Figura 22 evidencia os resultados de área percentual mais homogêneos, ou seja, com menor dispersão em relação à média.

Figura 22: Valor médio da área infectada por *C. albicans*, submetidas aos tratamentos com *C. lechleri* associados ou não ao ultrassom nas concentrações de 100 e 150 μL na frequência de 1 MHz e intensidade de 1 W/ cm^2 no tempo de 5 minutos de exposição.



* Controle (CONT), Fluconazol (FLU), *C. lechleri* 100 μL (CL100), *C. lechleri* 150 μL (CL150), UST (UST), UST+FLUCONAZOL (UST+FLU), UST+*C. lechleri* 100 μL (UST+CL100), UST+*C. lechleri* 150 μL (UST+CL150).

6 DISCUSSÃO

6.1 Gênero *Croton*

Observa-se na literatura científica relatos de pesquisas *in vitro* descrevendo a eficácia comprovada de espécies do gênero *Croton* frente à inibição de *C. albicans*, bem como, a outros agentes microbianos como: *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *S. mutans*.

Askari et al. (2012) e Poojar et al. (2017), confirmam em estudos recentes o uso de plantas medicinais no combate a espécies bacterianas e fúngicas *in vitro*, bem como, relatam que os compostos extraídos de plantas são capazes de combater doenças, com o mínimo de toxicidade para as células hospedeiras, sendo considerados candidatos para aperfeiçoamento de novos antimicrobianos (75,76).

Na mesma linha de raciocínio, Poojar et al. (2017) afirmam que as propriedades medicinais das plantas têm sido reconhecidas e têm gerado grande interesse devido ao seu fácil acesso, baixa toxicidade, viabilidade econômica e formas de fácil preparo como macerações, decocções, infusões, tinturas e óleos essenciais (75).

Em contrapartida, Beraud (2021) e Murray et al. (2022), descrevem que o uso indevido de medicamentos antimicrobianos intensificou, ocasionando o surgimento de patógenos multirresistentes, afetando cerca de cinco milhões de pessoas em todo o mundo e gerando alarme no sistema de saúde. Beraud (2021) e Murray et al. (2022), citam outros fatores relacionados à multirresistência: adaptação microbiana através de processos bioquímicos seletivos, automedicação na comunidade e a escassez no desenvolvimento de novas moléculas antimicrobianas que leva a escolhas de medicamentos antimicrobianos com um espectro e efeitos colaterais inadequadamente amplos, tornando o acesso a antimicrobianos essenciais mais caro (44,77).

Não obstante às propriedades medicinais das plantas descritas por Askari et al. (2012) e Poojar et al. (2017), Beraud (2021), Murray et al. (2022), Malveira (2022) e Khairan (2023) citam a atividade antifúngica do gênero *Croton*, bem como, Torrejón et al. (2016), Borba (2019) e Silva et al. (2022) confirmam a ação inibitória da espécie *C. lechleri* sobre *C. albicans*.

Silva et al. (2022), destacam o *C. lechleri* como propenso fitoterápico de ação antimicrobiana, evidenciando a ação inibitória do seu extrato para *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis* (77). Não obstante, Khairan (2023), afirma que a resina de sangue de dragão (*Daemonorops draco wild Blume*) é uma boa escolha como agente antimicrobiano frente a bactérias e fungos, exibindo atividades contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* (78).

O estudo de Malveira (2022), relata que o óleo essencial extraído das folhas de *Croton blanchetianus* foi ativo contra espécies de *C. albicans*, levantando a possibilidade de sua utilização como alternativa no combate às infecções (44).

Os experimentos relatados por Borba (2019) e Torrejón et al. (2016), corroboram e coincidem com os achados do presente estudo. Torrejón et al. (2016), comprovaram em seu ensaio laboratorial o efeito antifúngico *in vitro* do látex de *C. lechleri* sobre *C. albicans*, utilizando cinco concentrações por via etanólica. Confirmou-se a concentração mínima de 25% do fungicida, com valores inferiores a 16 UFC/mL, quando comparados ao grupo controle negativo (0%), onde desenvolveu-se 109 UFC/mL. Quanto à sensibilidade, foram obtidos diâmetros de zona de inibição de 6,13 mm para o Fluconazol (controle positivo) e diâmetros superiores a 12 mm, em média, para as diferentes concentrações de *C. lechleri*. O maior efeito antifúngico foi encontrado na concentração de 100%, com 14,19 mm (80,81). Os resultados de Torrejón et al. (2016) constataram a redução de UFC e o aumento do diâmetro do halo de inibição dos grupos tratados com *C. lechleri*, de acordo com o aumento da sua concentração, coincidindo com os resultados do presente experimento. Constatou-se que o *C. lechleri* teve maior significância do que o Fluconazol, tornando-o uma alternativa viável para a resistência deste antifúngico.

Borba (2019), obteve resultados significativos com o extrato à base de etanol de *C. lechleri* na avaliação da atividade antifúngica. A partir da cepa reativada, foram preparadas diluições 1:100, 1:1000, 1:10000. Observou-se resultados significativos, traduzidos pela formação de halos de inibição de 7mm, 8mm e 9mm, nas concentrações de 1:100, 1:1000 e 1:10000 (79). Corroborando com os resultados do presente experimento, o aumento do diâmetro do halo de inibição dos grupos tratados com *C. lechleri* foram superiores quando comparados aos grupos controle.

Apesar da utilização de metodologia diversa, as pesquisas de Torrejón et al. (2016) e Borba (2019), confirmam os resultados do presente experimento. Nos estudos de Torrejón et al. (2016) e Borba (2019), observa-se que a *C. albicans* foi suscetível ao *C. lechleri*,

ocasionando a redução no crescimento de levedura, traduzidos pelo aumento dos valores dos diâmetros dos halos de inibição formados. Este aumento apresentou-se significativo, corroborando com os resultados do experimento, no tocante a redução de UFC e área percentual. Supõe-se que este fitoterápico apresente em sua composição alguns princípios que lhe conferem capacidade antifúngica. Desta forma, espera-se que o *C. lechleri* constitua base para futuras pesquisas e desenvolvimento de tratamentos mais toleráveis e econômicos para pacientes que sofrem de candidíase (80,81).

Corroborando com o presente experimento, Malveira (2022), afirma que o efeito antifúngico do *Croton* contra *C. albicans* pode ser atribuído às suas propriedades medicinais encontradas principalmente na casca da árvore, como lignanas e polifenóis, que podem desnaturar as enzimas responsáveis pelo início da brotação. Acrescenta ainda, que devido ao seu caráter hidrofóbico, interagem com os lipídios da membrana citoplasmática, causando perda de integridade e de material celular, como íons, ATP e ácidos nucleicos, provocando a morte do fungo (44).

Diante de evidências científicas e resultados laboratoriais favoráveis e concordantes, o referido experimento apoiou-se na escolha do *C. lechleri* como antifúngico de escolha frente à inibição de *C. albicans*. É importante intensificar estudos que visem pesquisar novos agentes, a partir de extratos vegetais com potencial para o desenvolvimento de medicamentos para o enfrentamento de infecções fúngicas por *C. albicans*. Assim, espera-se que o *C. lechleri* constitua base para futuras pesquisas e desenvolvimento de tratamentos mais toleráveis e econômicos para pacientes que sofrem de candidíase, deixando-se aberta a possibilidade de experimentos posteriores com utilização de metodologia padronizada, a fim de análise comparativa mais ampla com outras pesquisas.

A busca por alternativas fitoterápicas em detrimento do uso de medicamentos convencionais ampara-se nas evidências científicas acerca das propriedades do *C. lechleri* frente a *C. albicans*, bem como, justifica-se pela declaração recente da OMS (Organização Mundial da Saúde) que classifica a *C. albicans* como patógeno crítico de ameaça global com alta incidência (81). Vale ressaltar a necessidade de estudos posteriores sobre a segurança e eficácia de alternativas terapêuticas isoladas ou em combinação com medicamentos convencionais ou fitoterápicos.

6.2 Ultrassom

A primeira aplicação do ultrassom terapêutico ocorreu na década de 50, desde então vem evoluindo rapidamente e sendo utilizado em diversas pesquisas, dentre elas, as que buscam comprovar sua eficácia frente a bactérias e fungos. As ondas ultrassônicas são capazes de gerar resultados terapêuticos, seja por seu efeito térmico ou ação mecânica (63).

No tocante ao uso do ultrassom associado a um antifúngico frente à inibição de *C. albicans* são poucos os relatos científicos presentes na literatura. Dentre os estudos correlatos ao uso de ultrassom frente a inibição de *C. albicans*, destaca-se a pesquisa de Yang et al. (2018) que utilizaram o ultrassom de baixa frequência e baixa intensidade combinado com Anfotericina B (AmB) carregadas com nanopartículas, confirmando os resultados do presente estudo, bem como, demonstrando um aumento significativo da morte celular de *C. albicans* (15).

Jain et al. (2018), evidenciam o uso do ultrassom de baixa intensidade, como técnica física não invasiva, eficiente, direcionável e controlável. Retratam o seu uso com sucesso para aumentar significativamente a permeabilidade da pele e da barreira hematoencefálica, aumentando a distribuição de drogas em tecidos sólidos, o que é conhecido como fenômeno da sonoforese (82).

Além disso, Rai et al. (2009), reforçam que a alta força de cisalhamento formada pelas ondas de choque e microjatos gerados pela vibração, compressão e colapso de microbolhas no processo de cavitação ultrassônica pode ser útil para melhorar a permeabilidade da membrana celular, pois sob alta tensão de cisalhamento, a viscosidade do muco reduz água, mas em baixas taxas de cisalhamento, o muco se comporta como um sólido elástico (1.000 a 10.000 vezes mais viscoso que a água) (83).

Corroborando com os resultados do presente experimento, Qiu et al. (2012), Hou et al. (2021) e Wu e Nyborg (2008) justificam a associação de nanopartículas ao ultrassom.

Qiu et al. (2012), evidenciam as propriedades e resultados das nanopartículas carregadas de drogas associadas ao ultrassom, justificando que a irradiação ultrassônica promove a ruptura das nanopartículas, aumentando a cavitação ultrassônica, o que

poderia aumentar ainda mais a permeabilidade da parede celular e melhorar a sensibilidade dos antibióticos. Relatam também que a associação do ultrassom com as nanopartículas são interrompidas por irradiação ultrassônica *in vitro*, bem como, o estágio inicial de cavitação é um processo limiar que se baseia na presença de núcleos ocos dentro do fluido. As nanopartículas podem ser consideradas como núcleos com cavitação artificial (84).

O estudo de Hou et al. (2021), confirma que a entrega de nanopartículas mediada pelo ultrassom de baixa intensidade criou muitos buracos na matriz extracelular dos talos e biofilmes de *C. albicans*, proporcionando um ambiente benéfico para a droga entrar no biofilme (85).

Além disso, Rosenthal (2004), afirma que a morfologia micelial de *C. albicans* sofreu os danos mais graves e perda da morfologia microbiana normal após o tratamento do ultrassom associado à AmB carregadas com nanopartículas. Os resultados revelam que o mecanismo pode estar associado ao efeito de cavitação e aumento das Espécies Reativas de Oxigênio intracelular, com consequente apoptose celular (71).

Segundo Wu e Nyborg (2008), após o tratamento combinado de ultrassom com nanopartículas carregadas de drogas, o dano do talo foi mais pronunciado do que com os outros tratamentos. Isto pode ocorrer pois a ruptura de nanopartículas melhoraram o efeito de cavitação acústica por algumas dinâmicas complexas, como microfluxo acústico ou microjato, aumentando a permeabilidade da parede celular e promovendo entrada de droga intracelular (86).

A pesquisa de Yang et al. (2023) sobre administração intravaginal de AmB carregadas de nanopartículas mediadas por ultrassom de baixa frequência frente à inibição de *C. albicans in vivo* corroborou com os resultados da presente pesquisa. Yang et al. (2023) demonstraram em seu estudo, o efeito antifúngico sinérgico e eficaz, fornecendo uma nova terapia não invasiva e segura para vaginite fúngica aguda ou recorrente, além de melhorar efetivamente o estado imunológico local (87).

Cai (2017) afirma que a irradiação ultrassônica também promoveu a distribuição de medicamentos para a área submucosa, proporcionando a possibilidade de remoção completa do fungo patogênico submucoso após a irradiação ultrassônica. O mecanismo de permeabilidade da membrana pode estar associado principalmente ao efeito de cavitação, com os fenômenos físicos extremos que o acompanham, como ondas de

choque, altas forças de cisalhamento e microjatos, contribuindo para quebrar a barreira de penetração do medicamento (14).

7 CONCLUSÃO

Os resultados do experimento demonstram a redução expressiva de unidades formadoras de colônias, bem como, da área percentual, quando da associação do ultrassom ao *C. lechleri* comparadas ao grupo controle. O grupo tratado com ultrassom associado ao *C. lechleri* na proporção de 100 µL por 5 minutos apresentou o resultado mais significativo, consoante a unidades formadoras de colônias, área percentual, tamanho médio, área total e índice de inibição relativa. O *software* ImageJ mostrou-se uma ferramenta importante para a contagem automatizada de colônias fúngicas, visto que a sua análise amplia e possibilita a interpretação da inibição de *C. albicans* consoante à área percentual, tamanho médio e área total.

Recomenda-se a direção de pesquisas futuras, com o aprimoramento da utilização do ImageJ, objetivando a melhoria dos processos desde o registro fotográfico até o estudo aprofundado da associação do ultrassom aos compostos fitoterápicos do *C. lechleri*, a fim de se obter investigações e resultados *in vivo*, ampliando os conhecimentos acerca de sua citotoxicidade, bem como, comprovando a eficácia de terapias alternativas em pacientes.

De acordo com os resultados experimentais obtidos, a associação do ultrassom ao *C. lechleri* tem grande potencial para aplicação na medicina, podendo ser considerada uma estratégia promissora para o tratamento das infecções causadas por *C. albicans*. Na perspectiva de estudos futuros, sugere-se também a investigação da associação do ultrassom com nanopartículas e *C. lechleri*.

8 REFERÊNCIAS

1. Pereira R, dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Moraes SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol*. 2021;131(1):11-22.
2. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. *Candida albicans*-the virulence factors and clinical manifestations of infection. *J Fungi*. 2021;7(2):1-19.
3. Pierce CG, Vila T, Romo JA, Montelongo-Jauregui D, Wall G, Ramasubramanian A, et al. The *Candida albicans* biofilm matrix: Composition, structure and function. *J Fungi*. 2017;3(1).
4. Bhattacharya S, Sae-Tia S, Fries BC. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics*. 2020;9(6):1-19.
5. Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem Rev*. 2021;121(6):3390–411.
6. Soares D, Lima E, Soares D, Silva N, Costa N, Faria F, et al. Candidíase vulvovaginal: uma revisão de literatura com abordagem para *Candida albicans*. *Brazilian J Surg Clin Res*. 2018;25(1):28-34.
7. Vieira AJH, Santos JI dos. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. *Rev Bras Análises Clínicas*. 2017;49(3):235-9.
8. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2019;25(7):792-8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028>
9. Berman J, Krysan DJ. Drug resistance and tolerance in fungi. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(6):319-31.
10. Risco E, Ghia F, Vila R, Iglesias J, Álvarez E, Cañigüeral S. Immunomodulatory Activity and Chemical Characterisation of Sangre de Drago (Dragon's Blood) from *Croton lechleri*. *Planta Med*. 2003;69(9):785-94.
11. Pona A, Cline A, Kolli SS, Taylor SL, Feldman SR. Review of future insights of Dragon's Blood in dermatology. *Dermatol Ther*. 2019;32(2):1-21.
12. Peres MTLP, Delle Monache F, Cruz AB, Pizzolatti MG, Yunes RA. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*. 1997;56(3):223-6.

13. Kooiman K, Roovers S, Langeveld SAG, Kleven RT, Dewitte H, O'Reilly MA, et al. Ultrasound-Responsive Cavitation Nuclei for Therapy and Drug Delivery. Vol. 46, *Ultrasound in Medicine and Biology*. Elsevier USA; 2020. p. 1296-325.
14. Cai Y, Wang J, Liu X, Wang R, Xia L. A review of the combination therapy of low frequency ultrasound with antibiotics. *Biomed Res Int*. 2017;2017:11-3.
15. Yang M, Xie S, Adhikari VP, Dong Y, Du Y, Li D. The synergistic fungicidal effect of low-frequency and low-intensity ultrasound with amphotericin B-loaded nanoparticles on *C. albicans* in vitro. *Int J Pharm*. 2018 May 5;542(1-2):232-41.
16. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases estimate precision. *J Fungi*. 2017;3(4).
17. Mercado Soares D, De Oliveira Lima E, Soares MM, Francisco N, Silva DA, Gabrielly N, et al. Candidíase vulvovaginal: Uma revisão de literatura com abordagem para *Candida albicans*. *Brazilian J Surg Clin Res* [Internet]. 2018;25(1):28-34. Available from: <http://www.mastereditora.com.br/bjscr>
18. Poulain D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol*. 2015;41(2):208-17.
19. Mukaremera L, Lee KK, Mora-Montes HM, Gow NAR. *Candida albicans* yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition. *Front Immunol*. 2017;8(JUN):1-12.
20. Kaur J, Nobile CJ. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2023;71:102237. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102237>
21. Nicholls S, MacCallum DM, Kaffarnik FAR, Selway L, Peck SC, Brown AJP. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2011;48(3):297–305. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2010.08.010>
22. Ciurea CN, Kosovski IB, Mare AD, Toma F, Pintea-Simon IA, Man A. *Candida* and candidiasis opportunism versus pathogenicity: A review of the virulence traits. *Microorganisms*. 2020;8(6):1-17.
23. Hanaoka M, Domae E. IL-1 α released from oral epithelial cells upon candidalysin exposure initiates an early innate epithelial response. *Int Immunol*. 2021;33(3):161-70.
24. Wibawa T. The role of virulence factors in *Candida albicans* pathogenicity. *J thee Med Sci (Berkala Ilmu Kedokteran)*. 2016;48(01):58-68.

25. Garcia-Rubio R, de Oliveira HC, Rivera J, Trevijano-Contador N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Front Microbiol.* 2020;10(January):1-13.
26. Turecka K, Chylewska A, Kawiak A, Waleron KF. Antifungal activity and mechanism of action of the Co(III) coordination complexes with diamine chelate ligands against reference and clinical strains of *Candida* spp. *Front Microbiol.* 2018;9(JUL):1-14.
27. Priya A, Pandian SK. Piperine Impedes Biofilm Formation and Hyphal Morphogenesis of *Candida albicans*. *Front Microbiol.* 2020;11(May):1–18.
28. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013;4(2):119-28.
29. Zavrel M, White TC. Medically important fungi respond to azole drugs: An update. *Future Microbiol.* 2015;10(8):1355-73.
30. Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. *PLoS Pathog.* 2013;9(9).
31. Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, Prévost G, Bernardi T, Jehl F. Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Front Microbiol.* 2020;10(January):1-12.
32. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2018;16(1):19–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>
33. Girelli KM, Benedetti VP. Perfil de sensibilidade de isolados de *Candida albicans* de diferentes sítios anatômicos frente ao Fluconazol. *Arq Ciências da Saúde da UNIPAR.* 2018;22(3):171-5.
34. Delarze E, Sanglard D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2015;23:12-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2015.10.001>
35. Bartlett JG. Guidelines for treatment of candidiasis. *Infect Dis Clin Pract.* 2004;12(4):245–6.
36. Macias-Paz IU, Pérez-Hernández S, Tavera-Tapia A, Luna-Arias JP, Guerra-Cárdenas JE, Reyna-Beltrán E. *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2023;55(2):189-98. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.08.003>

37. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2015;62(4):e 1-50.
38. Lombardi A, Ouanounou A. Fungal infections in dentistry: Clinical presentations, diagnosis, and treatment alternatives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2020;130(5):533-46.
39. Musiol R, Kowalczyk W. Azole Antimycotics - A Highway to New Drugs or a Dead End? *Curr Med Chem*. 2012;19(9):1378-88.
40. Qin Y, Zhang L, Xu Z, Zhang J, Jiang YY, Cao Y, et al. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. *Virulence* [Internet]. 2016;7(5):512-26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1138201>
41. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *Eur J Intern Med* [Internet]. 2016;34:21-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2016.06.029>
42. Heard SC, Wu G, Winter JM. Antifungal natural products. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2021;69:232-41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.02.001>
43. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629-55.
44. Malveira EA, Souza PFN, Neto NAS, Aguiar TKB, Rodrigues NS, Henrique CWB, et al. Essential Oil from *Croton blanchetianus* Leaves: Anticandidal Potential and Mechanisms of Action. *J Fungi*. 2022;8(11).
45. Samuelson P. Economic Calculation in the Socialist Commonwealth by Ludwig von Mises (1920). *Econ Theory*. 1990;(1920):1-32.
46. Scorzoni L, Sangalli-Leite F, de Lacorte Singulani J, de Paula e Silva ACA, Costa-Orlandi CB, Fusco-Almeida AM, et al. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2016;123:68-78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.02.005>
47. Shao J, Cui YY, Zhang MX, Wang TM, Wu DQ, Wang CZ. Synergistic In Vitro activity of sodium houttuynfonate with fluconazole against clinical *Candida Albicans* strains under planktonic growing conditions. *Pharm Biol* [Internet].

- 2017;55(1):355–9. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1237977>
48. Rossiter SE, Fletcher MH, Wuest WM. Natural Products as Platforms to Overcome Antibiotic Resistance. *Chem Rev.* 2017;117(19):12415-74.
 49. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis.* 2008;46(1):120-8.
 50. Barbieri DSV, Tonial F, Lopez PVA, Sales Maia BHLN, Santos GD, Ribas MO, et al. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2014;59(9):887-96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.05.006>
 51. Leite TR, da Silva MAP, Dos Santos ACB, Coutinho HDM, Duarte AE, da Costa JGM. Antimicrobial, modulatory and chemical analysis of the oil of *croton limae*. *Pharm Biol* [Internet]. 2017;55(1):2015-9. Available from: <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1355926>
 52. Casao T del RL, Pinheiro CG, Sarandy MM, Zanatta AC, Vilegas W, Novaes RD, et al. *Croton urucurana* Baillon stem bark ointment accelerates the closure of cutaneous wounds in knockout IL-10 mice. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2020;261:113042. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113042>
 53. Cordeiro KW, Felipe JL, Malange KF, Do Prado PR, De Oliveira Figueiredo P, Garcez FR, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2016;183:128–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.051>
 54. Jones K. Revisão Sangue De Dragão *Jornal De Medicina Complementar E Alternativa.* 2003;9(6):877-96.
 55. Gupta D, Bleakley B, Gupta RK. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. *J Ethnopharmacol.* 2007;115(3):361-80.
 56. Pimentel BS, Negri G, Cordeiro I, Motta LB, Salatino A. Taxonomic significance of the distribution of constituents of leaf cuticular waxes of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Biochem Syst Ecol* [Internet]. 2020;92(May):104106. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104106>
 57. Salatino A, Salatino M, Negri G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of. *J Braz Chem Soc.* 2007;18(1):11-33.

58. Rossi J, Souza SP de, Machado KE. Perspectivas do Uso de *Croton lechleri*: Revisão Sistemática na Prevenção do Envelhecimento Cutâneo. *ID line Rev Psicol.* 2023;17(67):77-92.
59. Fão F, Zan RA, Maria F, Brondani M, Ramos LJ, Ulises De D, et al. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. *SaBios Rev Saúde e Biol [Internet].* 2012;(1):91–8. Available from: <http://www.revista.grupointegrado.br/sabios/>
60. Lopes MILE, Saffi J, Echeverrigaray S, Henriques JAP, Salvador M. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *J Ethnopharmacol.* 2004;95(2–3):437-45.
61. Azevedo K, Alechandre A, Lima Á, Campos CA, Costa J, Pereira MA, et al. Guia para a extração de sangue de grado (*Croton lechleri* Müll. Arg.) Recomendações técnicas para a extração de látex de sangue de dragão. 2008;5-27.
62. Escobar-garcía JD, Prieto C, Pardo-figuerez M, Lagarón JM. Microencapsulação de Seiva de Sangue de Dragão em Whey Protein Concentrar e Zein Usando Eletropulverização Assistida por Tecnologia de Gás Pressurizado. 2023;
63. Spratt HG, Levine D, Tillman L. Physical therapy clinic therapeutic ultrasound equipment as a source for bacterial contamination. *Physiother Theory Pract.* 2014;30(7):507-11.
64. Olsson DC, Martins VMV, Pippi NL, Mazzanti A, Tognoli GK. Ultra-som terapêutico na cicatrização tecidual. *Ciência Rural.* 2008;38(4):1199-207.
65. Oliveira DP. Estudo do campo térmico do ultrassom terapêutico em phantom do terço médio do braço com e sem implantes metálicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2013.
66. Hitchcock TM, Dobke MK. Review of the safety profile for microfocused ultrasound with visualization. *J Cosmet Dermatol.* 2014;13(4):329-35.
67. Meunier D, Woodford N, Hopkins KL. Evaluation of the AusDiagnostics MT CRE EU assay for the detection of carbapenemase genes and transferable colistin resistance determinants *mcr-1/-2* in MDR Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(12):3355-8.
68. Liu C, Wang J, Cao Z, Chen W, Bi H. Variation of dissolved organic nitrogen concentration during the ultrasonic pretreatment to *Microcystis aeruginosa*. *Ultrason Sonochem.* 2016;29:236-43.

69. Van Wamel A, Kooiman K, Harteveld M, Emmer M, ten Cate FJ, Versluis M, et al. Vibrating microbubbles poking individual cells: Drug transfer into cells via sonoporation. *J Control Release*. 2006;112(2):149-55.
70. Mahulkar A V., Riedel C, Gogate PR, Neis U, Pandit AB. Effect of dissolved gas on efficacy of sonochemical reactors for microbial cell disruption: Experimental and numerical analysis. *Ultrason Sonochem* [Internet]. 2009;16(5):635-43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.11.005>
71. Rosenthal I, Sostaric JZ, Riesz P. Sonodynamic therapy a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrason Sonochem*. 2004;11(6):349-63.
72. Logan K, Foglietta F, Nesbitt H, Sheng Y, McKaig T, Kamila S, et al. Targeted chemo-sonodynamic therapy treatment of breast tumours using ultrasound responsive microbubbles loaded with paclitaxel, doxorubicin and Rose Bengal. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2019;139(April):224-31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.04.003>
73. Yoshida M, Kobayashi H, Terasaka S, Endo S, Yamaguchi S, Motegi H, et al. Sonodynamic Therapy for Malignant Glioma Using 220-kHz Transcranial Magnetic Resonance Imaging-Guided Focused Ultrasound and 5-Aminolevulinic acid. *Ultrasound Med Biol*. 2019;45(2):526-38.
74. Al Askari G, Kahouadji A, Khedid K, Mousaddak M, Ouaffak L, Charof R, et al. Evaluation of Antimicrobial Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts of Leaves of *Vitis vinifera* Collected from Different Regions in Morocco. *J Agric Environ Sci*. 2012;12(1):85-90.
75. Poojar B, Ommurugan B, Adiga S, Thomas H, Sori RK, Poojar B, et al. Methodology Used in the Study. *Asian J Pharm Clin Res*. 2017;7(10):1-5.
76. Beraud G. Shortages Without Frontiers: Antimicrobial Drug and Vaccine Shortages Impact Far Beyond the Individual! *Front Med*. 2021;8(February):1-6.
77. do Nascimento A, Almeida K, Nunes T, Sales M, Alves R, dos Santos Y, et al. Avaliação da ação antimicrobiana do látex de *Croton lechleri* Müll . *Arg . (Euphorbiaceae) em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas* Evaluation of the antimicrobial action of *Croton lechleri* Müll latex . *Arg . (Euphorbiaceae) in Gram-*. *Res Soc Dev*. 2022;11(16):1-10.
78. Khairan K, Arini M, Idroes R, Awang K, Jacob C. Antibacterial Activity of n-Hexane Dragon's Blood Resin Extract (*Daemonorops draco* wild Blume) from Bener Meriah, Aceh Province, Indonesia. *Malacca Pharm*. 2023;1(1):22-9.

79. Borja EHH. Atividade antifúngica de extratos de plantas *Croton lechleri* e *Maytenus laevis* em espécies de *Candida albicans* ATCC 10231. [Ambato Equador]: Universidade Técnica de Ambato; 2019.
80. Torrejon SMV, Honores MJC. Efeito antifúngico in vitro do látex de *Croton lechleri* (grau sanguíneo) contra *Candida albicans* ATCC 10231. *Pueblo Cont.* 2016;27(1):89-94.
81. Organization WH. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. *Saudi Med J* [Internet]. 2022 Nov;43(11):1284-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36379529>
82. Jain A, Tiwari A, Verma A, Jain SK. Ultrasound-based triggered drug delivery to tumors. *Drug Deliv Transl Res.* 2018;8(1):150-64.
83. Rai VK, Mishra N, Yadav KS, Yadav NP. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications [Internet]. Vol. 270, *Journal of Controlled Release.* Elsevier B.V; 2018. 203–225 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.049>
84. Qiu Y, Zhang C, Tu J, Zhang D. Microbubble-induced sonoporation involved in ultrasound-mediated DNA transfection in vitro at low acoustic pressures. *J Biomech* [Internet]. 2012;45(8):1339-45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.03.011>
85. Hou Y, Yang M, Li J, Bi X, Li G, Xu J, et al. The enhancing antifungal effect of AD1 aptamer-functionalized amphotericin B-loaded PLGA-PEG nanoparticles with a low-frequency and low-intensity ultrasound exposure on *C.albicans* biofilm through targeted effect. *NanoImpact* [Internet]. 2021;21:100275. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100275>
86. Wu J, Nyborg WL. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(10):1103-16.
87. Yang M, Cao Y, Zhang Z, Guo J, Hu C, Wang Z, et al. Administração intravaginal de drogas carregadas com nanopartículas mediadas por ultrassom de baixa intensidade: um esquema de terapia sinérgica eficaz para o tratamento da candidíase vulvovaginal. *Rev Nanobiotecnologia.* 2023;21(53):1-20.