



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

SABRINA DE MOURA ROVETTA

**EFEITOS DO JATO DE PLASMA FRIO SOB PRESSÃO
ATMOSFÉRICA SOBRE *Candida albicans***

2019

SABRINA DE MOURA ROVETTA

**EFEITOS DO JATO DE PLASMA FRIO SOB PRESSÃO
ATMOSFÉRICA SOBRE *Candida albicans***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia/Imunologia. Linha de pesquisa: Métodos de controle de micro-organismos de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Tit. Cristiane Koga Ito
Coorientadora: Profa. Dra. Aline Chiodi Borges

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Rovetta, Sabrina de Moura

Efeitos do jato de plasma frio sob pressão atmosférica sobre *Candida albicans* / Sabrina de Moura Rovetta. - São José dos Campos : [s.n.], 2019. 65 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2019.

Orientadora: Cristiane Yumi Koga-ito

Coorientadora: Aline Chiodi Borges

1. *Candida albicans*. 2. Jato de plasma. 3. Microscopia de força atômica. 4. Espectroscopia no infra-vermelho. I. Koga-ito, Cristiane Yumi, orient. II. Borges, Aline Chiodi, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Guilherme Rodrigues Teodoro

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Walter Miyakawa

Instituto de Estudos Avançados - IEAv

Divisão de Fotônica

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 12 de setembro de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico a conquista deste trabalho, o qual eu tenho tanto orgulho de ter executado, ao meu querido marido Otávio Nogueira, por todo o seu amor e cumplicidade em todos os momentos, e por não deixar eu desistir nunca.

Ao meu grande amor, meu filho Júlio César, por dar um significado único em minha vida.

Ao meu pai, e à Simone, por acreditarem e me apoiarem desde a primeira vez que idealizei este sonho.

Por fim, dedico esta obra a todos que de algum modo, possam em um futuro ser beneficiados pelo conhecimento que este trabalho gerou.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder o milagre da vida, e por todas as maravilhosas obras que realizou em minha vida.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, campus de São José dos Campos, ao Programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal, Docentes e pessoal técnico administrativo.

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

À minha orientadora Profa Tit. Cristiane Yumi Koga-Ito, por absolutamente tudo, por acreditar em mim, ter sempre palavras sábias e motivadoras em momentos que não eram favoráveis, por acreditar e apoiar à realização das técnicas utilizadas neste trabalho, não tão corriqueiras na rotina da microbiologia. Obrigada por ser amiga e humana, compreender as limitações humanas, obrigada por me inspirar todos os dias.

À minha coorientadora Profa Dra. Aline Chiodi Borges por toda atenção e carinho e assistência na execução deste projeto.

Ao Prof. Tit. Luis Rogério de Oliveira Hein e ao seu aluno de Doutorado Maurício de Oliveira Filho, por toda a sua atenção e ajuda e dedicação na obtenção das difíceis micrografias de força atômica.

Ao Prof. Tit. Professor Konstatin Georgiev Kostov e Thalita Mayumi Castaldeli Nishime, por todo o apoio na execução deste trabalho.

Ao Prof. Tit. Gilmar Thim (ITA) e à sua aluna de doutora Beatriz Menezes por toda a ajuda na obtenção dos espectros de FTIR e micrografias no FEG.

À Assistente de Suporte Acadêmico Clélia Aparecida de Paiva, pela amizade, ouvido, colo e todos os repiques e meios de cultura plaqueados, por toda ajuda, ensinamentos e suporte incondicional na realização deste trabalho.

Aos meus caros colegas de laboratório Aline, Néia, Lady Daiane, Mariana, Laura, Gabriela, Márcia, Magno e Leandro, por compartilharem comigo momentos agradáveis, de muito trabalho proza e risadas e mais trabalho.

Ao Prof. Dr. Walter Miyakawa por toda a consultoria remota, e principalmente por ter apresentado e despertado em mim a paixão pela pesquisa.

À toda a minha família, em especial, Pai, Si, Patrícia, Alexandre e Otávio por acreditar, ajudar literalmente e por me apoiarem incondicionalmente nesta fantástica jornada em busca do conhecimento. Aos meus sogros por todo o apoio

Aos amigos, todos eles, em especial a Poli e Ryan por terem paciência comigo em todos os momentos que eu dizia “não posso, tenho que fazer as coisas do mestrado”.

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original". Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Jato de Plasma Frio sob Pressão Atmosférica.....	16
3.2 Cepas e Condições de Crescimento	17
3.3 Determinação da concentração inibitória mínima de caspofungina frente a <i>C. albicans</i>	18
3.4 Efeito do plasma frio sob pressão atmosférica sobre <i>C. albicans</i>	19
3.5 Preparo das amostras para as análises microscópicas e espectroscópica ..	20
3.6 Análise morfológica e topográfica das células de <i>Candida albicans</i> por microscopia de força atômica (AFM).....	22
3.7 Análise morfológica de <i>Candida albicans</i> por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	24
3.8 Análise celular bioquímica por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	24
3.9 Análise dos Dados.....	25
4 RESULTADOS.....	27
4.1 Determinação da concentração inibitória mínima de caspofungina frente a <i>C. albicans</i>	27
4.2 Exposição de <i>C. albicans</i> SC 5314 e Cepa Clínica ao Plasma Frio	27
4.3 Análise morfológica e topográfica das células de <i>Candida albicans</i> por microscopia de força atômica (AFM) da cepa referência SC5314	28

4.4 Análise morfológica de <i>Candida albicans</i> por microscopia de eletrônica de varredura (MEV)	39
4.5 Análise celular bioquímica por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).....	42
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60

Rovetta SM. Efeitos do jato de plasma frio sob pressão atmosférica sobre *Candida albicans* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

As infecções causadas por *Candida albicans* são consideradas um desafio importante na área médica. Além dos antifúngicos convencionais apresentarem elevada toxicidade, casos de resistência de *C. albicans* a estes medicamentos têm sido descritos com frequência. Devido a estas limitações do uso de antifúngicos, a busca por terapias alternativas é alvo crescente de estudos. Dentre as novas terapias, o jato de plasma frio destaca-se a como agente eficaz frente a cepas de *C. albicans*, sendo considerada uma alternativa promissora. Seu efeito antifúngico é associado à presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio liberadas, assim como de íons e fótons. Todavia até o presente momento, o exato mecanismo de ação não foi elucidado. Portanto, o objetivo deste estudo é prospectar os efeitos do jato de plasma frio sobre *C. albicans*. Perseguindo este objetivo, foram utilizadas duas técnicas complementares às técnicas microbiológicas clássicas, a espectroscopia no Infra-vermelho (FT-IR) e a microscopia de força atômica (AFM). Suspensões padronizadas da cepa *C. albicans* SC 5314 e 1 cepa clínica foram expostas ao jato de plasma. A seguir, foram analisadas por espectroscopia no infra-vermelho (FT-IR) e microscopia de força atômica (AFM) para identificar os efeitos do plasma sobre a parede celular de *C. albicans*. Controle negativo (sem exposição) e positivo (caspofungina) também foram analisados. Os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes e a análise estatística foi realizada ao nível de significância de 5 %. As alterações morfológicas e topográficas nas células tratadas com plasma foram similares às do grupo tratado com caspofungina. O perfil bioquímico das células após tratamento com o plasma foi também similar ao das células tratadas com caspofungina. Conclui-se que o plasma agiu diretamente sobre as estruturas da parede celular fúngica, mais especificamente sobre os polissacarídeos, com provável influencia na redução de glucanos e aumento de mananas e quitinas. Esse remodelamento da parede celular pode ter correlação com as alterações morfológicas observadas, tais como mudança no tamanho da célula e aumento da rugosidade superficial.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Jato de plasma. Microscopia de força atômica. Espectroscopia no infra-vermelho.

Rovetta SM. Cell effects of atmospheric pressure low temperature plasma jet on Candida albicans [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

Infections caused by Candida albicans are considered important challenges in the medical area. Besides the high toxicity of conventional antifungals, cases of C. albicans resistance have been reported with increasing frequency. Due to these limitations of the antifungals, the search for alternative therapies is increasing. Among these therapies, cold plasma showed effectiveness against C. albicans isolates and is considered a promising alternative. Its antifungal effect is associated to the presence of oxygen and nitrogen reactive species, as well as ions. Nonetheless, the exact mechanism of action on C. albicans has not yet been elucidated. The aim of this study is to investigate the effects of plasma jet on C. albicans cell wall. For this purpose, two techniques complementing to classic the microbiological methods were used, the infrared spectroscopy (FT-IR) and atomic force microscopy (AFM). Standardized suspensions of C. albicans SC 5314 and 1 clinical isolate was exposed to plasma jet. Samples were analyzed by FT-IR and AFM to identifying the effects of plasma on C. albicans. Negative control (no exposition) and positive (caspofungin) were also analyzed. The experiments will be done in triplicate in three independent experiments and the statistical analyzes were done adopting the level of significance of 5%. The morphological and topographic alterations in cells treated with plasma were similar to the group treated with caspofungin. The biochemical profile of the cells after treatment with the plasma jet was also similar to those treated with caspofungin. It could be concluded that plasma acted directly on the structures of fungal cell wall, more specifically on polysaccharides, influencing the reduction of glucans and increased of mannans and chitins. This remodeling of cell wall can be correlated with the detected morphological alterations, such as changes in cell size and increase in superficial roughness.

Keywords: Candida albicans. Plasma jet. Atomic force microscopy. Infrared spectroscopy.

1 INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* podem causar desde lesões superficiais até infecções sistêmicas, sendo que as últimas são relacionadas a altas taxas de mortalidade (Ahmad et al., 2016; Hasim et al., 2017).

Por ser um fungo oportunista, a ocorrência dessas infecções é frequente em pacientes imunocomprometidos (Ahmad et al., 2016; Hasim et al., 2017). Pacientes HIV-positivos (Franco et al., 2017; Jayatilake and Samaranayake, 2010; Ramos-e-Silva et al., 2012), pacientes transplantados (Kim et al., 2019; Machado et al., 2016; Prasad et al., 2019), idosos (Varade, Burkemper, 2013) portadores de doenças crônicas, como o diabetes (Machado et al., 2016; de la Rosa-García et al., 2013), recém-nascidos (Rodrigues et al., 2019), pacientes em tratamento com antibióticos e corticosteroides (Beyer et al., 2019; Cordeiro et al., 2019; Havlickova et al., 2008) e pacientes hospitalizados são frequentemente acometidos por infecções causadas por *C. albicans* (Franco et al., 2017; Hasim et al., 2017; Kosalec et al., 2017). *C. albicans* está no ranking dos micro-organismos mais frequentemente envolvidos em infecções hospitalares (Ahmad et al., 2016).

O número de opções terapêuticas disponíveis é reduzido, já que os antifúngicos convencionais apresentam toxicidade elevada (Chudzik, Koselski, 2015). Além disso, é crescente o relato de cepas resistentes aos antifúngicos convencionais (Beyer et al., 2019; Cordeiro et al., 2019), como frente aos azóis (Franco et al., 2017; Machado et al., 2016) e à anfotericina B (Ahmad et al., 2016; Chudzik, 2015). Tendo em vista as limitações dos tratamentos convencionais disponíveis atualmente, a busca por novas terapias é alvo crescente de pesquisas (Ahmad et al., 2016).

O jato de plasma frio sob pressão atmosférica tem mostrado efeito

promissor no controle micro-organismos de relevância médica (Heaselgrave et al., 2016; Mohd Nasir et al., 2016; Nishime et al., 2017; Takeda et al., 2017), apresentando efetividade sobre *C. albicans* ; (Delben et al., 2016; Doria, 2013; Handorf et al., 2018, 2019; Nishime et al., 2017; Kostov et al., 2015). Recentemente, foi relatado o efeito inibitório do plasma sobre a aderência e filamentação de *C. albicans* (Chiodi Borges et al., 2017). Efeito positivo no tratamento de candidose bucal induzida em modelo murino também foi recentemente descrito (Borges et al., 2018).

Sabe-se que o jato de plasma libera espécies reativas tanto de oxigênio quanto de nitrogênio, assim como íons e radiação, componentes que são responsáveis pelos danos nas estruturas e componentes celulares como parede celular, membrana, proteínas e DNA (Doria, 2015; Kostov et al., 2015; Nishime et al., 2017). Todavia, o mecanismo de ação do jato de plasma com a célula microbiana ainda não está elucidado. O entendimento do mecanismo de ação é essencial para o aprimoramento dos protocolos de aplicação clínica da nova terapia.

Portanto, a utilização de técnicas complementares às de microbiologia e microscopia clássicas, podem ser uma ferramenta poderosa na elucidação do mecanismo de ação do jato de plasma. As técnicas de espectroscopia vibracional, tanto a absorção no infravermelho, quanto a Raman, têm sido aplicadas na caracterização de micro-organismos, pois são rápidas, de custo baixo, fornecem dados quali e quantitativos e geram impressões digitais espectroscópicas específicas (região química específica) (Aguiar et al., 2015; Taha et al., 2013; Silva, 2010). A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), também permite comparar as diferenças morfológicas que uma mesma espécie pode apresentar, como o caso do dimorfismo em *C. albicans* (Adt et al., 2006).

As técnicas microscópicas convencionais, como microscopia óptica e

MEV podem apontar alterações morfológicas, porém não é possível saber especificamente qual estrutura celular foi a responsável pela mudança morfológica. Já a técnica espectroscópica revela em quais regiões químicas da estrutura houve alterações, o que agrega informações relevantes na elucidação de mecanismos de ação (Silva, 2010). A microscopia de fluorescência também se mostra promissora na elucidação de mecanismos de ação, contudo é uma técnica ainda de custo muito elevado, devido à utilização de anticorpos monoclonais (Hasim et al., 2017).

Entre as técnicas microscópicas, a microscopia de força atômica (AFM – “Atomic Force Microscopy”), destaca-se devido à possibilidade de mensurar quantitativamente as alterações morfológicas e topográficas que os micro-organismos sofrem em relação à exposição aos diferentes tratamentos (Hasim et al., 2017; Orasmo et al., 2013). A AFM é uma técnica baseada na força de interação entre a amostra e uma ponta fina, com raio nominal na escala de nanômetros que fica na extremidade de uma haste (*cantilever*). A varredura da amostra é realizada mantendo um parâmetro constante. Os sinais capturados e regulados por um piezoelétrico através dos movimentos de deflexão da haste são detectados por um sensor de óptico e convertidos em micrografias, que revelam dados quali e quantitativos da topografia analisada, além de imagens em terceira dimensão (Francois et al., 2013).

A utilização da AFM tem sido sugerida para a detecção de alterações celulares após o tratamento com antifúngicos. Esta técnica foi importante para elucidar o processo de desmascaramento do β -(1,3)-glucano e sua correlação com a interação com o sistema imune e geração de resposta (Hasim et al., 2017). Ainda, ao utilizar o antifúngico caspofungina, os mesmos autores relataram a exposição da camada do monossacarídeo manose que encobre o β -(1,3)-glucano (Hasim et al., 2017), levando à superfície da parede celular com maior rugosidade em relação ao controle.

A associação entre o AFM e ATR-FTIR foi utilizada com sucesso para a avaliação do efeito de concentrações altas e baixas de caspofungina sobre *C. albicans*, fornecendo informações sobre a morfologia, mecânica e composição das paredes celulares (Quiles et al., 2017).

Sabendo-se que células de *C. albicans* expostas ao jato de plasma apresentam alterações estruturais observadas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Nishime et al., 2017), os usos da associação entre o FT-IR e AFM pode auxiliar na compreensão desse efeito e apontar as principais moléculas-alvo na superfície celular fúngica.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do estudo foi prospectar os possíveis mecanismos de ação do jato de plasma frio, sob pressão atmosférica sobre cepas (Clínica e referência) de *C. albicans*, analisando seus efeitos sobre a parede celular fúngica.

2.2 Objetivos específicos

- a) Utilizar as microscopias de força atômica (AFM) e eletrônica de varredura (MEV) para avaliar alterações estruturais na parede celular fúngica após exposição ao jato de plasma, nos parâmetros efetivos previamente determinados;
- b) Utilizar FT-IR para identificar mudanças na composição química da parede celular responsáveis por alterações estruturais em células de *C. albicans* expostas ao jato de plasma;
- c) Avaliar, utilizando a associação entre MEV, AFM e FT-IR, os efeitos do plasma sobre a parede da célula fúngica em comparação a um antifúngico convencional com mecanismo de ação sobre parede celular.

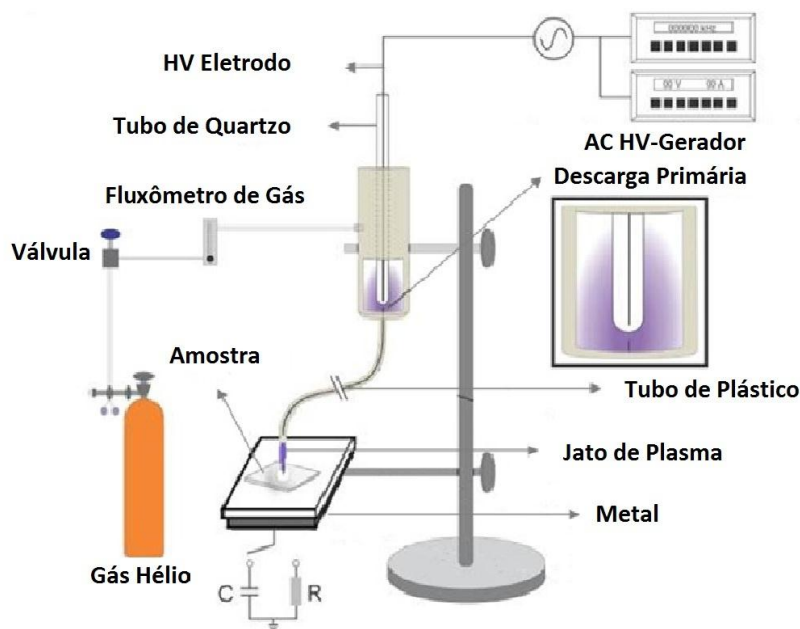
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Jato de Plasma Frio sob Pressão Atmosférica

O jato de plasma frio em pressão atmosférica foi gerado dentro de um cilindro de quartzo contendo um fio fino (0,45 mm) de Ni-Cr, o qual estava conectado a um gerador de alta tensão alternada (Minipuls4 da GBS, Elektronik, Dresden, Germany), capaz de gerar sinais com tensões de até 40 kV p-p, com frequência de operação entre 5 e 40 kHz. Neste estudo, utilizou-se o gás hélio (He) 99,5 % de pureza, com a vazão de 2 l/minuto que foi controlada por um controlador de fluxo de massa. A potência utilizada foi a de 1,8 W em modo de tensão pulsada (MP), com a frequência de 31 kHz. Nessas condições, o jato de plasma possuiu um comprimento de aproximadamente 2,5 cm (Kostov et al., 2015) e temperatura inferior a 40 °C.

A distância entre a saída do jato de plasma e a superfície a ser tratada foi a de 1,5 cm. O tempo de tratamento foi de 120 segundos. A Figura 1 mostra a representação esquemática do tratamento das lâminas de vidro com jato de plasma.

Figura 1 - Representação esquemática do equipamento gerador do jato de plasma frio sob pressão atmosférica



Fonte: Adaptado de Kostov et al., 2015.

3.2 Cepas e Condições de Crescimento

Neste estudo, foi utilizada a cepa de referência de *Candida albicans* SC 5314, e a cepa clínica P29, ambas permaneceram armazenadas em caldo Sabouraud, com 20% de glicerol, a - 80 °C.

A utilização da cepa clínica, previamente isolada em estudo anterior (Chiodi Borges et al., 2017), foi aprovada pelo Comitê de ética em Pesquisa (CAAE: 31787814.1.0000.0077). A cepa foi isolada a partir de paciente com candidose bucal sob prótese total.

Os inóculos utilizados para avaliar os efeitos do jato de plasma sobre células leveduriformes foram obtidos a partir de culturas, cultivadas em ágar

Sabouraud dextrose (SD), a 37°C por 24 horas. Essas células foram suspensas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%). Cada técnica, devido às características, experimentais ou do equipamento, necessitou de uma concentração celular diferente, como mostra a Tabela 1.

Os inóculos foram padronizados com o auxílio de um espectrofotômetro (λ : 550 nm), com diferentes densidades ópticas (DO) (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentrações celulares utilizadas nas diferentes técnicas (λ : 550 nm)

Técnicas	Concentração	Densidade Óptica (DO)
AFM	10 ⁷ células/ml	0,564
FTIR/MEV	10 ⁸ células/ml	1,754
Plasma/MIC	10 ⁶ células/ml	0,380

Fonte: Elaborado pela autora.

3.3 Determinação da concentração inibitória mínima de caspofungina frente a *C. albicans*

O ensaio foi realizado em conformidade com a norma (CLSI M-27 A3 (2008)). Os inóculos da cepa referência SC 5314 e da cepa clínica, na concentração de 10⁶ UFC/ml foram preparados, segundo descrito no item 3.2. Em seguida, foram diluídos em caldo RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute broth 1640) (pH 7,0), obtendo-se uma concentração final de 10³ UFC/ml.

A caspofungina foi diluída em RPMI a uma concentração igual a 32 µg/ml, para iniciar a microdiluição com o antifúngico na concentração de 16 µg/ml. Em uma placa de 96 poço foi adicionado aos 12 poços da primeira fileira, 100 µl caldo RPMI, e subsequentemente, adicionou-se ao primeiro poço 100 µl do fármaco. A partir deste, realizou-se a microdiluição em série até o 10º poço (16 µg/ml a 0,301 µg/ml). Por último, adicionou-se, a todos os poços, 10 µl/ml do inóculo.

As microplacas foram incubadas, por 24 horas, a 37°C. A primeira leitura foi realizada após 24 horas e a segunda após 48 horas de incubação. Os experimentos foram realizados em triplicata em três ocasiões diferentes. As leituras foram realizadas de acordo com o documento M27-A3, considerando como concentração inibitória mínima (CIM) onde foi observado 50% de inibição de crescimento em relação ao grupo controle.

Os ensaios foram realizados em triplicata, em três ocasiões diferentes.

3.4 Efeito do plasma frio sob pressão atmosférica sobre *C. albicans*

Utilizou-se os inóculos na concentração de 10⁶ UFC/ml das cepas de *C. albicans* anteriormente citadas, e depositou-se sobre as lâminas de vidro, gotas 5 µl, e após secagem, depositou-se novamente 5 µl, até atingir o volume de 60 µl. Essa deposição foi realizada gradualmente para que, o volume se concentrasse em um ponto específico, formando um botão. Subsequentemente as lâminas foram transferidas para tubos estéreis contendo 2 ml de caldo RPMI. Este grupo foi denominado como controle (apenas o inóculo de *C. albicans* sem tratamento). Ao grupo com tratamento a plasma, utilizou-se o mesmo método de deposição do inóculo sobre as lâminas e na sequência foi realizado, o tratamento

com plasma por 120 segundos, sob os parâmetros supracitados no item 3.1 (Jato de Plasma Frio sob Pressão Atmosférica). Estas células também foram transferidas para os tubos com meio de cultura, e foram incubados por 24 horas. Em seguida, realizou-se diluição em série (10^{-1} até 10^{-6}), e 3 μl das diluições de 10^{-3} a 10^{-6} foram plaqueadas pela técnica de Miles e Misra (1931), em ágar Saboraud. Para determinação do valor mínimo inibitório de crescimento microbiano, realizou-se a contagem de UFC ml^{-1} , após o crescimento por 24 horas.

3.5 Preparo das amostras para as análises microscópicas e espectroscópica

Os grupos experimentais foram: I) Teste (exposto ao plasma), II) Controle negativo (não exposto ao plasma) e III) Controle positivo (caspofungina).

Após padronização, definiu-se diferentes volumes de inóculos para cada uma das técnicas analíticas (Tabela 2), esses inóculos foram depositados sobre lâminas de vidro estéreis (1x1 cm), e então expostas ao jato de plasma por 120 segundos.

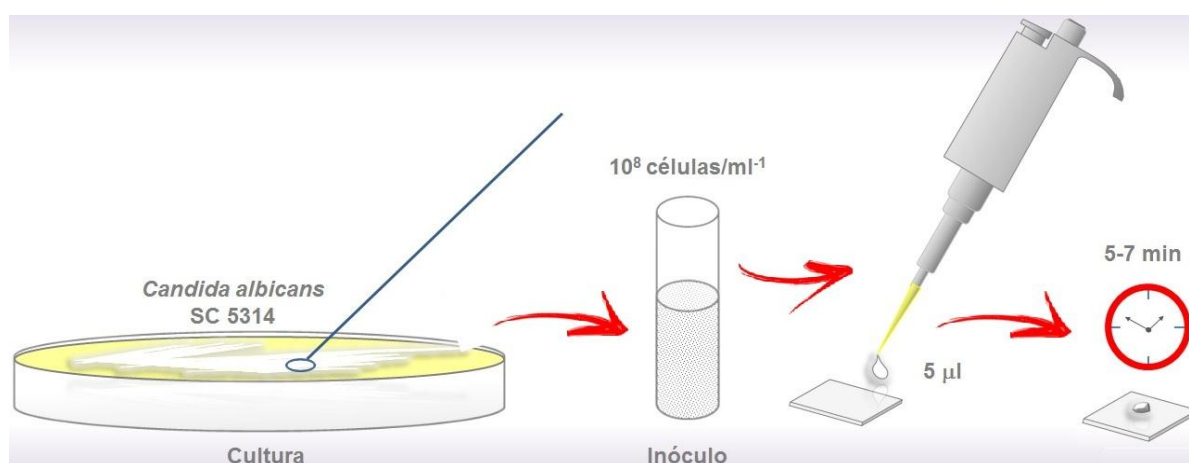
Tabela 2 – Volume de inóculo utilizado nas diferentes técnicas

Técnicas	Volume (μl)
AFM	10 μl
FTIR	60 μl
MEV	20 μl

Fonte: Elaborado pela autora.

Para análise bioquímica no FTIR, no modo ATR, para haver uma densidade celular adequada de acordo com a capacidade de detecção do equipamento sem interferência, foi necessário depositar gotas de 5 em 5 μl sobre as lâminas de vidro até atingir o volume de 60 μl . A cada gota depositada, foi necessário esperar que a mesma secasse (5-7 min), para que o líquido não escorresse pela lâmina e se concentrasse em um ponto específico, formando um botão, como mostrado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema de preparo das lâminas para análises espectroscópicas



Fonte: Elaborado pela autora.

Para as demais técnicas analíticas, o volume total foi depositado sobre as lâminas de uma única vez.

Para a preparação do grupo controle positivo com o antifúngico caspofungina, utilizou-se o 100 μl do fármaco na concentração inibitória mínima (CIM: 0,0625 $\mu\text{g/ml}$), em contato com 100 μl dos inóculos em diferentes concentrações, de acordo com a Tabela 1, por 24 horas. Após esse período, realizou-se o procedimento de deposição das gotas sobre as lâminas supracitado.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

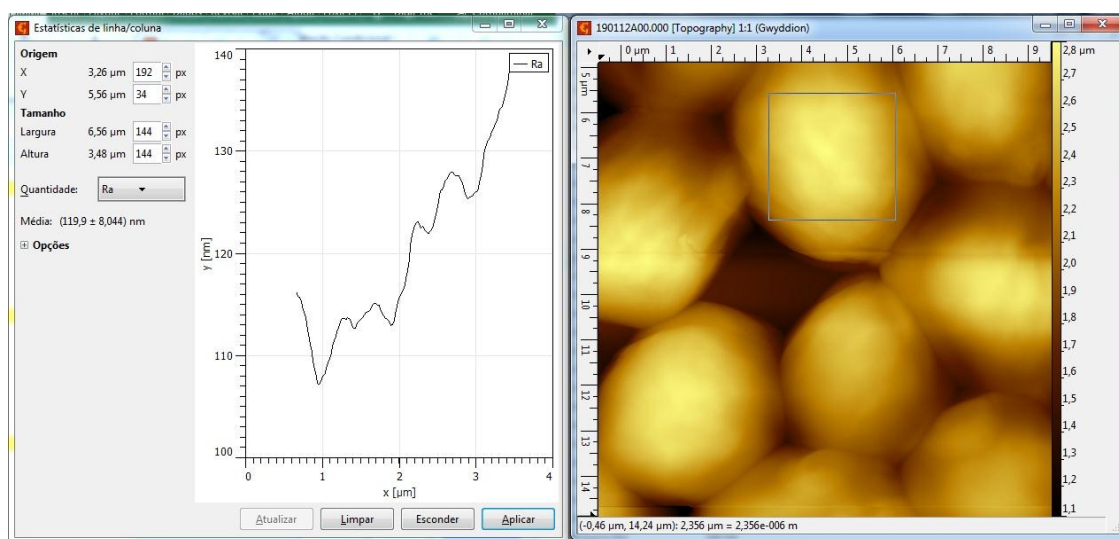
3.6 Análise morfológica e topográfica das células de *Candida albicans* por microscopia de força atômica (AFM)

As lâminas contendo as suspensões controle e expostas aos tratamentos (jato de plasma por 120 segundos e a caspofungina por 24 horas) secaram por 48 horas, a temperatura de 28°C, dentro do fluxo laminar.

As análises de morfologia e topografia foram realizadas no microscópio de força atômica (Shimadzu, 64 spt9600-j3) do laboratório de caracterização de materiais da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista. As micrografias foram obtidas em modo de contato intermitente com 0,5 Hz de taxa de escaneamento, e com ponta de silício ($k = 50 \text{ N/m}$).

Foram calculados parâmetros de rugosidade aritmética (R_a) e rugosidade da média das alturas máximas (R_z) (Figura 3), em uma área de $2,81 \times 2,81 \mu\text{m}^2$, em 25 células isoladas de cada grupo. Este valor é representativo em relação ao comprimento da célula em ambos os eixos, quanto longitudinal quanto transversal.

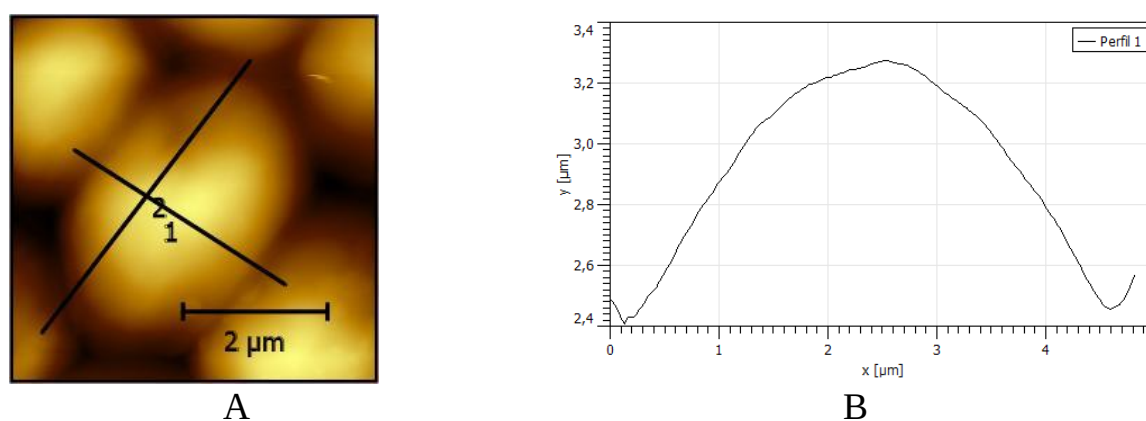
Figura 3 - Cálculo de rugosidade em uma área definida da célula



Fonte: Elaborado pela autora.

Utilizando as linhas de perfil, foram calculada as alturas, comprimento e largura de 25 células, e então calculou-se a média e desvio padrão. Dividiu-se a célula em dois planos, como demonstrado na Figura 4A, transversal (1) e longitudinal (2).

Figura 4 - (A) representação dos planos de divisão da célula e (B) linha de perfil do eixo transversal



Fonte: Elaborado pela autora.

3.7 Análise morfológica de *Candida albicans* por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As lâminas contendo suspensões controle e expostas aos tratamentos (jato de plasma e caspofungina) foram mantidas em uma solução de glutaraldeído a 2% por duas horas para fixação das células. Subsequentemente, as lâminas foram lavadas em solução salina e expostas a diferentes concentrações de solução de etanol (70% e 95%) por 10 minutos em cada uma. Por último, as lâminas ficam imersas por 20 minutos na solução de etanol 100%. Após estas etapas de desidratação, as lâminas secaram por 24 horas em temperatura de 28°C dentro do fluxo laminar.

Posteriormente, as lâminas foram metalizadas com filme fino de ouro, por 40 segundos, em 40mA (Quorum, Q15OR ES) (Nishime et al., 2017). As análises morfológicas das células de *C. albicans* foram obtidas através de microscopia eletrônica de varredura em 5kV, em diferentes ampliações 1.000x, 5.000x, 1.0000x, 25.0000x, 50.000x (MIRA 3, TESCAN).

3.8 Análise celular bioquímica por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

As lâminas de vidro contendo as suspensões tratadas com plasma e caspofungina (controle positivo) e as não tratadas (controle negativo), após a deposição em lâmina, permaneceram em repouso dentro do fluxo laminar por 24 horas, para eliminação de água residual, que poderia interferir nas análises.

Coletaram-se os dados utilizando o espectrômetro Frontier Perkin Elmer

400, do laboratório do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA) no modo reflexão total atenuada (ATR).

A varredura foi realizada de 400 a 4000 cm^{-1} , na resolução 6 cm^{-1} . Foram realizadas 64 varreduras por ponto amostral, sob essas condições, segundo Adt et al. (2006), levando-se 100 segundos para obter um espectro de FT-IR. Os espectros foram pré-processados, inicialmente corrigiu-se a linha de base pelo software do próprio equipamento (Opus 4.2, Bruker optics), em seguida, no software Origin Lab 8.0, normalizou-se vetorialmente os espectros.

Para reduzir a presença de ruídos sem significância espectroscópica, utilizou-se o filtro de suavização de Savitzky-Golay, que é amplamente empregada em espectroscopia (Lima, 2015), utilizou-se polinômio de segunda ordem com uma janela de 11 pontos espectrais.

Posteriormente, realizou-se o cálculo de segunda derivada, esta ferramenta matemática maximiza pontos onde exista uma inclinação/concavidade da função estudada (Lima, 2015), o que permitiu analisar isoladamente, e com um nível detalhamento maior, os picos de um determinado grupo funcional.

Pode-se, ainda, efetuar uma análise semiquantitativa dos grupos funcionais (polissacarídeos, proteínas e lipídeos), através do ajuste de curva (fitting-curve), utilizando o valor calculado da área sob a curva.

Por fim, realizou-se a média dos 9 espectros obtidos para realização das análises qualitativas e cálculo de áreas.

3.9 Análise dos Dados

Foram analisados estatisticamente os dados obtidos utilizando o software

Origin Lab 8.0. Realizaram-se os testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e Análise de Variância – ANOVA One Way (post hoc Tukey's Test) com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

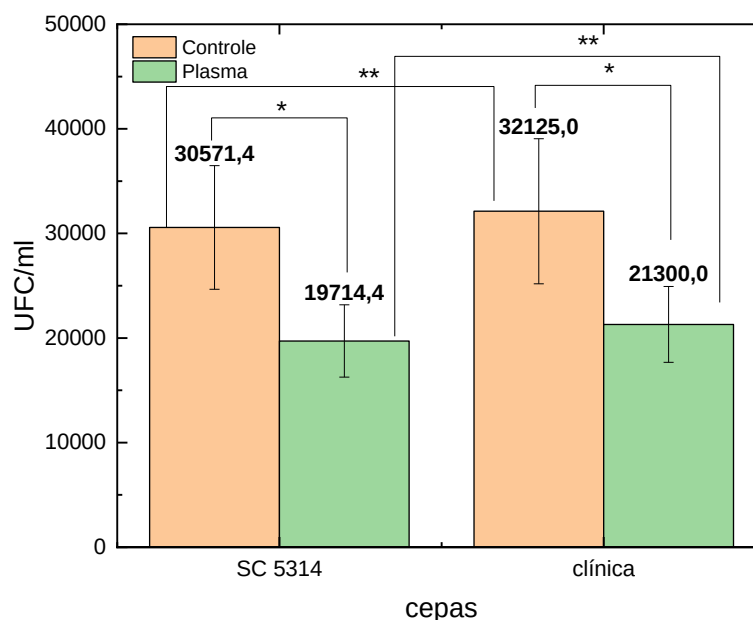
4.1 Determinação da concentração inibitória mínima de caspofungina frente a *C. albicans*

Após 24 horas de incubação da microplaca, realizou-se uma leitura qualitativa (visual) e determinou-se a CIM no poço 9, o qual equivalia à concentração do fármaco de 0,0625 µg/ml. Este valor de concentração inibitória mínima foi igual para ambas as cepas (referência e clínica). A leitura com 48 horas mostrou o mesmo resultado.

4.2 Exposição de *C. albicans* SC 5314 e Cepa Clínica ao Plasma Frio

Após contagem do número de colônias (UFC/ml) da cepa referência, notou-se que houve uma redução estatística significativa no grupo tratado com plasma em relação ao grupo controle de 35,5%, o mesmo comportamento foi observado na cepa clínica, onde a redução foi de 33,7% (Figura 5).

Figura 5 - Comparação da redução de UFC/ml de *Candida albicans* (SC 5314 e cepa clínica) após tratamento com plasma



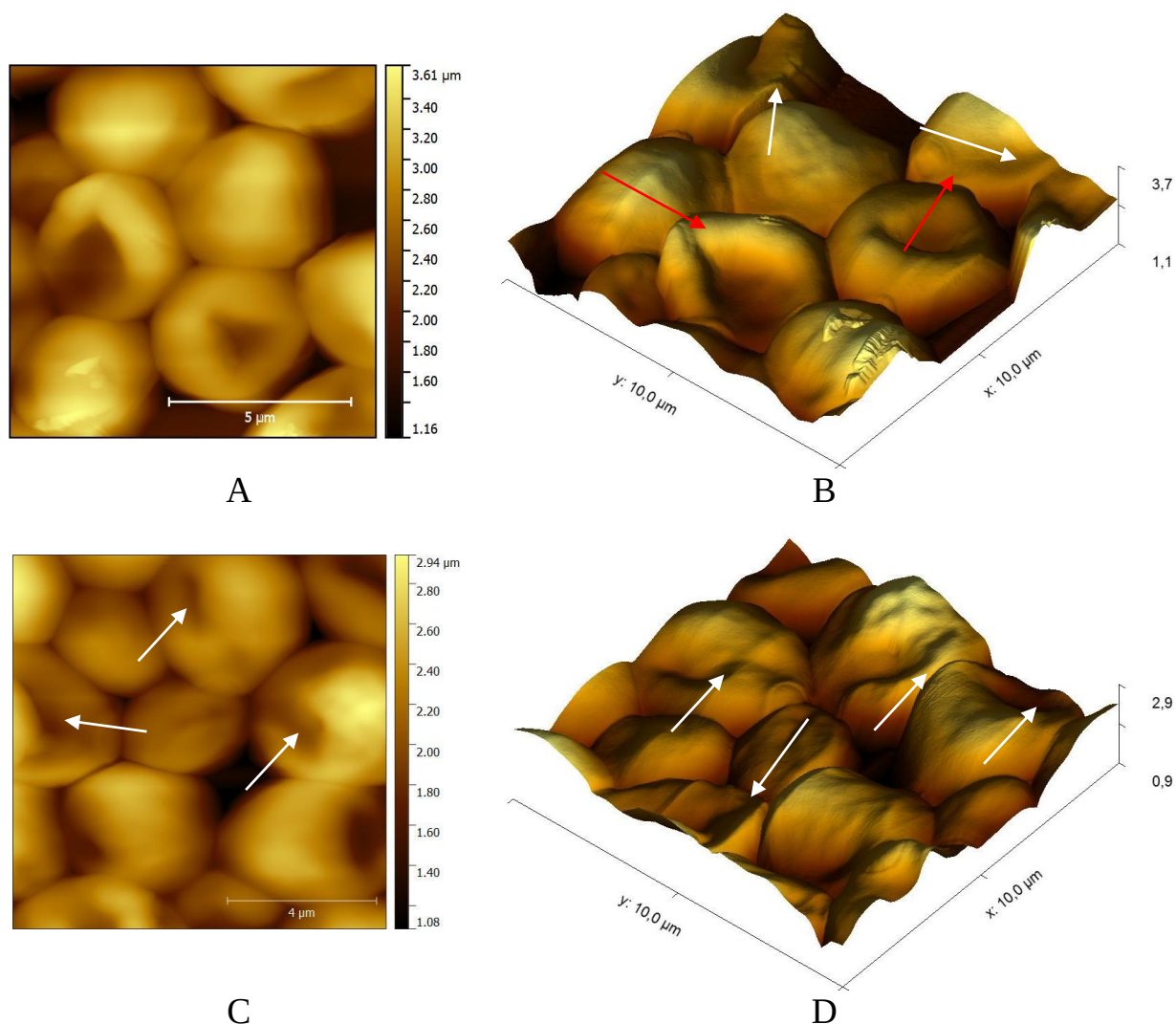
Legenda: Gráficos com comparação entre grupo controle e plasma, (*) diferença estatística ($p < 0,05$), (**) não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 Análise morfológica e topográfica das células de *Candida albicans* por microscopia de força atômica (AFM) da cepa referência SC5314

A Figura 6 (A-D) mostra micrografias representativas do grupo controle, com a presença de células normais e desintumescidas, morfologia circular, e algumas das quais apresentam estruturas características de *C. albicans* como a presença de cicatrizes de brotamento, indicada pelas setas vermelhas.

Figura 6 - Micrografias de força atômica do grupo controle: A e C) mapa de topografia e; B e D) deflexão em 3d nas imagens



Fonte: Elaborado pela autora.

A análise das micrografias de diferentes células do grupo controle (Figura 6A a 6D), revelaram que, a maioria das células estavam hígidas, confirmaram que as elas são esféricas a ovaladas, e não sugeriram alterações morfológicas significativas no seu tamanho quando comparada ao grupos com tratamento (plasma e caspofungina) (Figura 7).

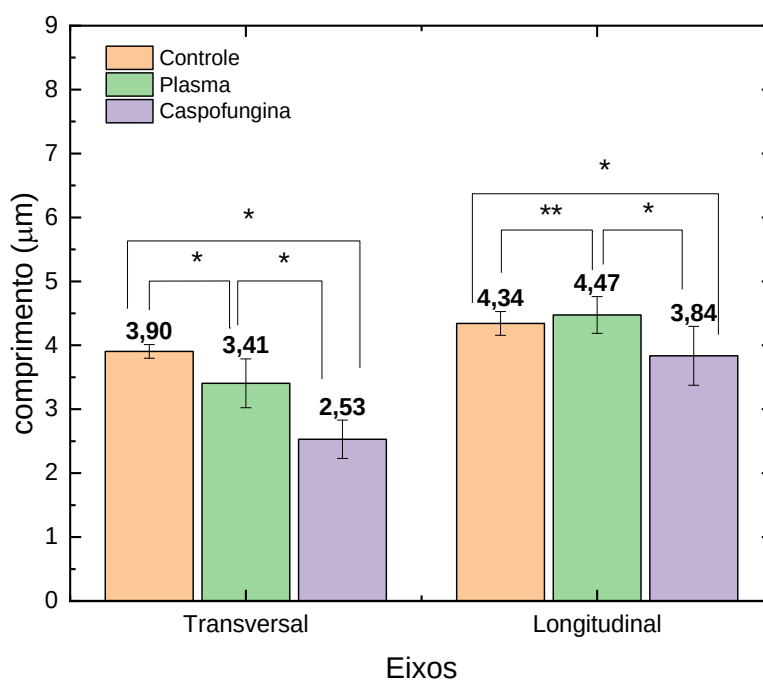
Comparando o grupo controle ao tratado com plasma, observou-se o comprimento da célula no eixo longitudinal sem alterações significativas, mas

no eixo transversal notou-se uma diminuição de 12%, Esse fenômeno foi ainda mais expressivo no grupo tratado com caspofungina, onde a redução foi de 35%. O tratamento com caspofungina, afetou também o comprimento no eixo longitudinal, onde houve uma redução de 11% comparado ao grupo controle.

Em relação à altura, utilizando o recurso de análise de perfil (Figura 4B), calculou-se uma altura estimada para as células, subtraiu-se os valores entre o ponto mais alto e o mais baixo das células, e a Figura 8 mostra que não há diferença nas alturas das células comparando intra-grupos os dois eixos, o que valida as medições realizadas.

O grupo controle apresentou-se células mais altas (entumecidas), quando comparada aos grupos com tratamentos. Após o tratamento com o plasma houve redução estatística significativa de 39,3% e 33,1%, nos eixos longitudinal e transversal respectivamente. Essas medidas corroboram a quantidade significativa de células desintumescidas observadas na Figura 13 (A-D). O grupo tratado com caspofungina também apresentou redução na altura das células em relação ao grupo controle de 37% e 36% nos eixos longitudinal e transversal. O interessante, entretanto, é que não houve variação significativa nas alturas do grupo exposto ao plasma, quando comparado, ao grupo tratado com caspofungina.

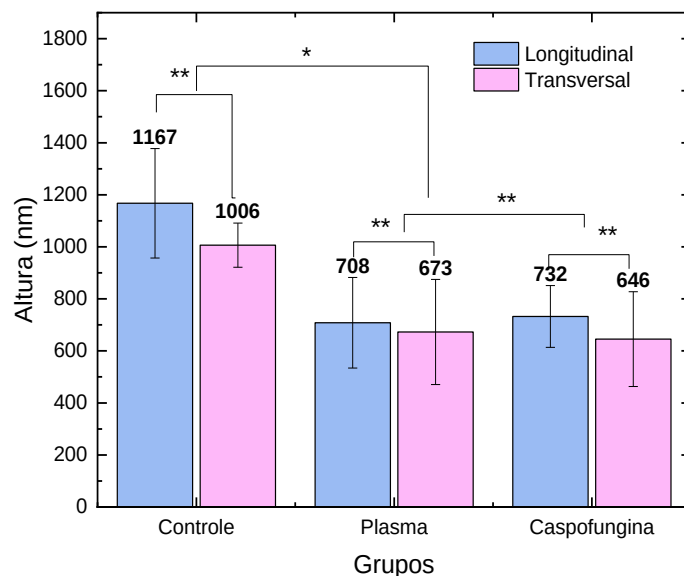
Figura 7 - Gráfico comparativo dos comprimentos das células de *Candida albicans* nos dois eixos, nos grupos tratados (plasma e caspofungina), em relação ao controle



Legenda: Gráficos com comparação entre os comprimentos entre os grupos, (*) diferença estatística ($p < 0,05$), (**) não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 8 - Gráfico comparativo das alturas das células de *Candida albicans* nos eixos, nos grupos tratados (plasma e caspofungina), em relação ao controle

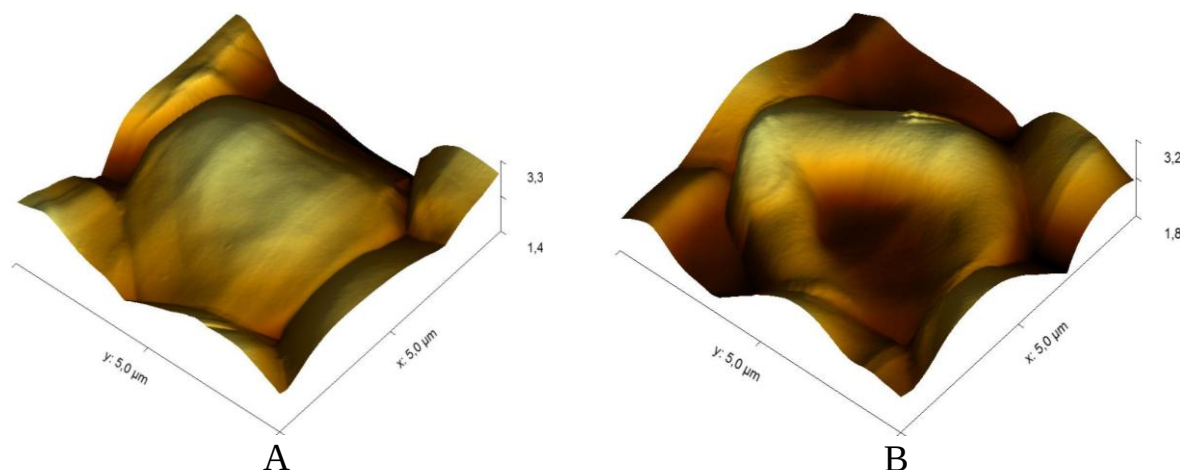


Legenda: Gráficos com comparação intra e entre grupo das alturas nos diferentes eixos, (*) diferença estatística ($p < 0,05$), (**) não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Ao avaliar isoladamente algumas células do grupo controle, observou-se superfícies pouco irregulares (Figura 9A), com leves ondulações, incluindo uma célula desintumescida (Figura 9B). Todavia, após o tratamento com o plasma, as superfícies das células apresentaram perceptivelmente irregularidades, com aspecto de ondas.

Figura 9 - Micrografias em 3d do grupo controle de células isoladas, com diferentes morfologias

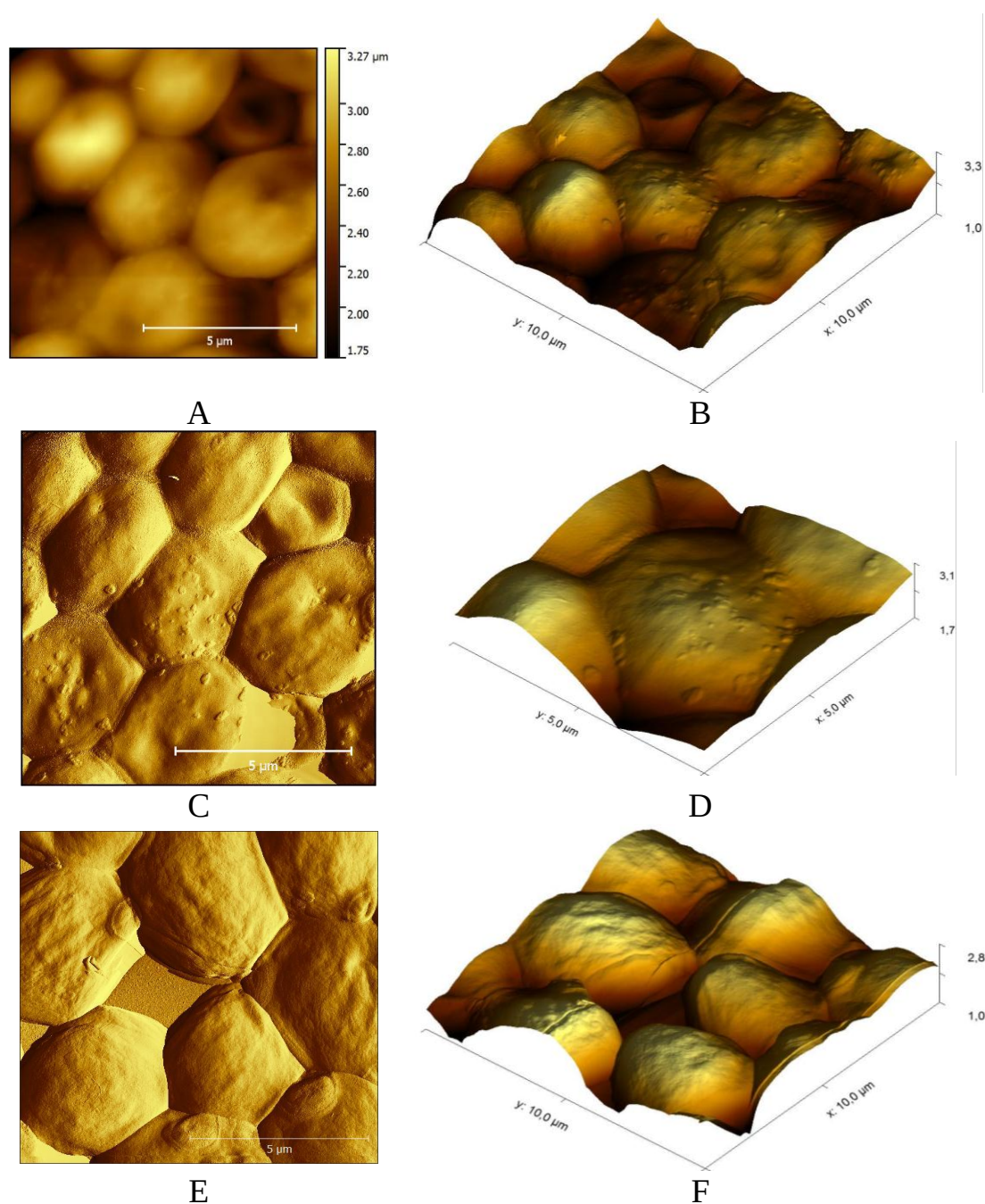


Legenda: (A) Célula normal e (B) Célula desintumescida.
Fonte: Elaborado pela autora.

Outro achado, que não foi observado no grupo controle, foi a presença de pequenos grânulos (Figura 10A), que puderam ser melhor visualizados ao utilizar o mapa de deflexão (Figura 10B-D), modo, que permite visualizar estruturas de baixo relevo, como pequenos grânulos sobre as superfícies celulares.

Mensurou-se, na análise topográfica, os parâmetros de rugosidade das superfícies celulares, e notou-se (Figura 11), que a rugosidade aritmética do grupo controle foi menor (99 nm) em relação ao dos demais grupos, assim como, a rugosidade Rz (Figura 12), que também se manteve com os valores reduzidos em relação aos demais grupos com tratamento (plasma e caspofungina). Estes valores corroboram com a análise visual, que demonstrou uma superfície mais suavizada em relação aos grupos com tratamento.

Figura 10 - Micrografias do grupo tratado por plasma



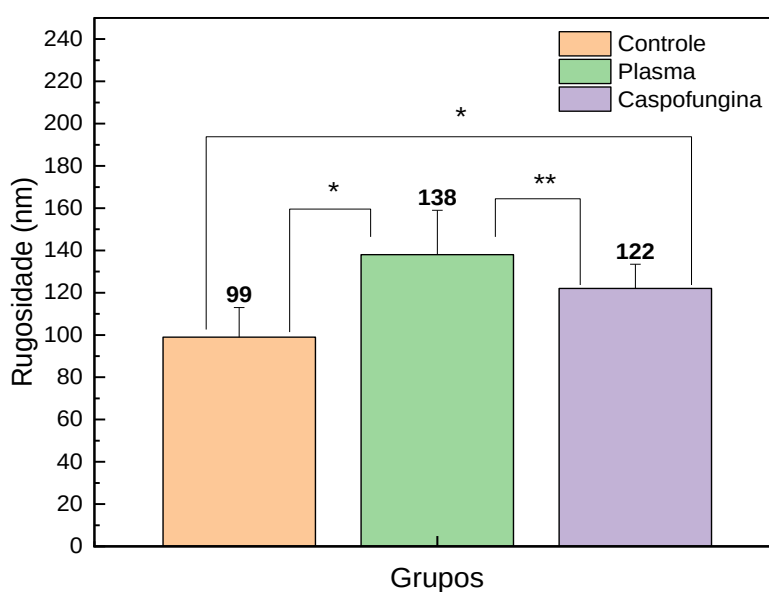
Legenda: A) mapa de topografia; B) deflexão em 3d; C e E) mapa de deflexão e D e F) topografia em 3d de uma célula isolada.

Fonte: Elaborado pela autora.

De fato, observaram-se irregularidades sobre as superfícies das células tratadas com plasma (Figura 13A-D) e com caspofungina (Figura 14B-E).

Essas alterações visuais, foram reflexo dos parâmetros de rugosidade que aumentaram, o Ra era 99 nm e passou a 138 nm nas células expostas ao plasma (Figura 11), e atingiu uma variação 28,2% em relação ao controle. Não houve, contudo, diferença estatística do grupo tratado com caspofungina. A rugosidade Rz saltou de 255 nm para 303 nm (Figura 12), e apresentou um aumento de 15,8% de regiões mais profundas sobre a superfície celular, todavia não houve diferença em relação ao grupo tratado com caspofungina.

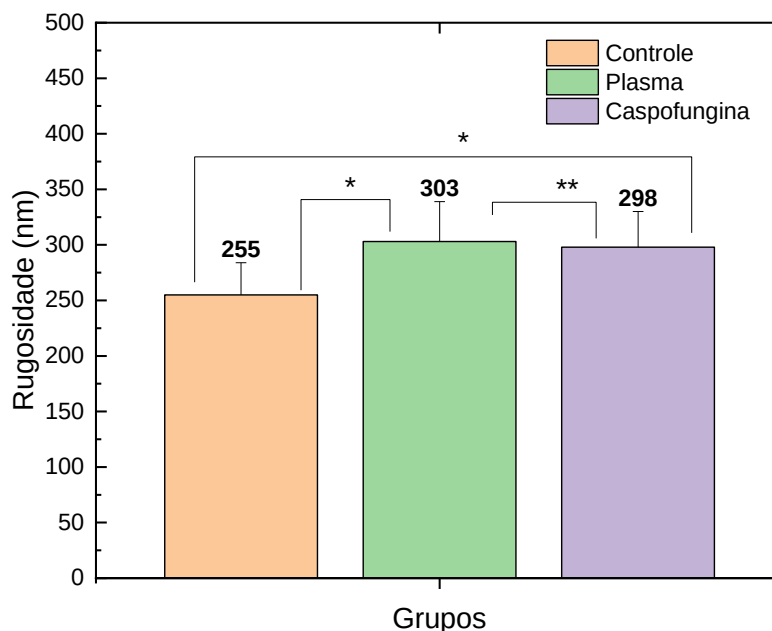
Figura 11 - Comparação da rugosidade aritmética entre os grupos plasma, caspofungina e controle



Legenda: Gráficos com comparação das rugosidades aritméticas entre os grupos, onde (*) houve diferença estatística ($p < 0,05$) e (**) não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 12 - Comparação da rugosidade Rz entre os grupos plasma, caspofungina e controle

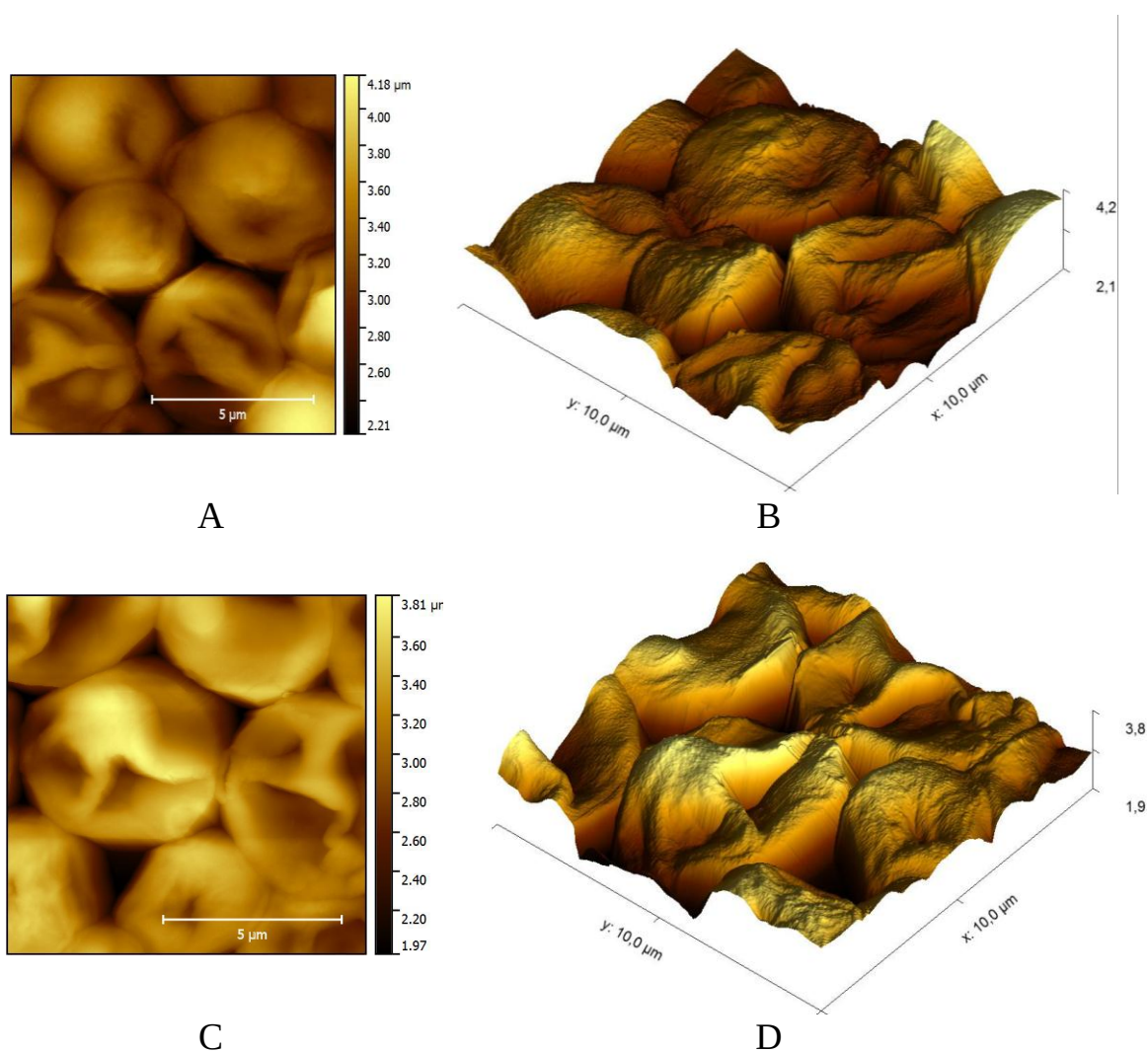


Legenda: Gráficos com comparação das rugosidades Rz entre os grupos, onde (*) houve diferença estatística e (**) não houve diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

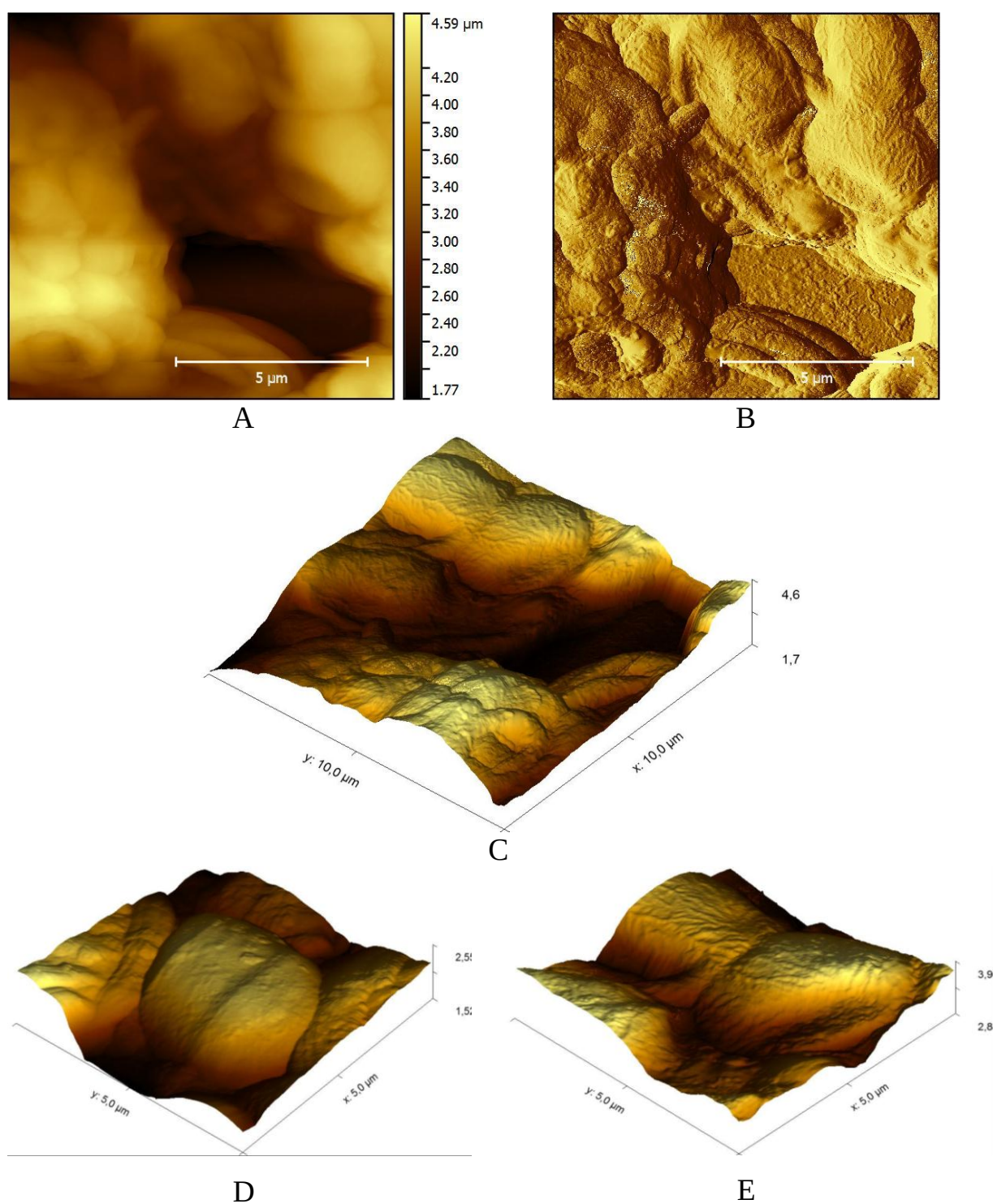
Embora a sobreposição de células no grupo tratado com caspofungina seja bem maior do que nos demais grupos, Figura 14A a visualização das modificações de superfície, puderam ser observadas com o mapa de deflexão e em terceira dimensão (Figura 14B e 14C). As irregularidades na superfície das células tratadas com o antifúngico também apresentaram aspecto enrugado, bem semelhantes as observadas nas células tratadas com plasma.

Figura 13 - Micrografias do grupo tratado por plasma



Legenda: A e C) mapa de topografia; B e D) topografia em 3d.
 Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 14 - Micrografias do grupo tratado por caspofungina



Legenda: A) mapa topográfico; B) mapa de deflexão; C) topografia em 3d; D e E ampliação em 3d de células isoladas.

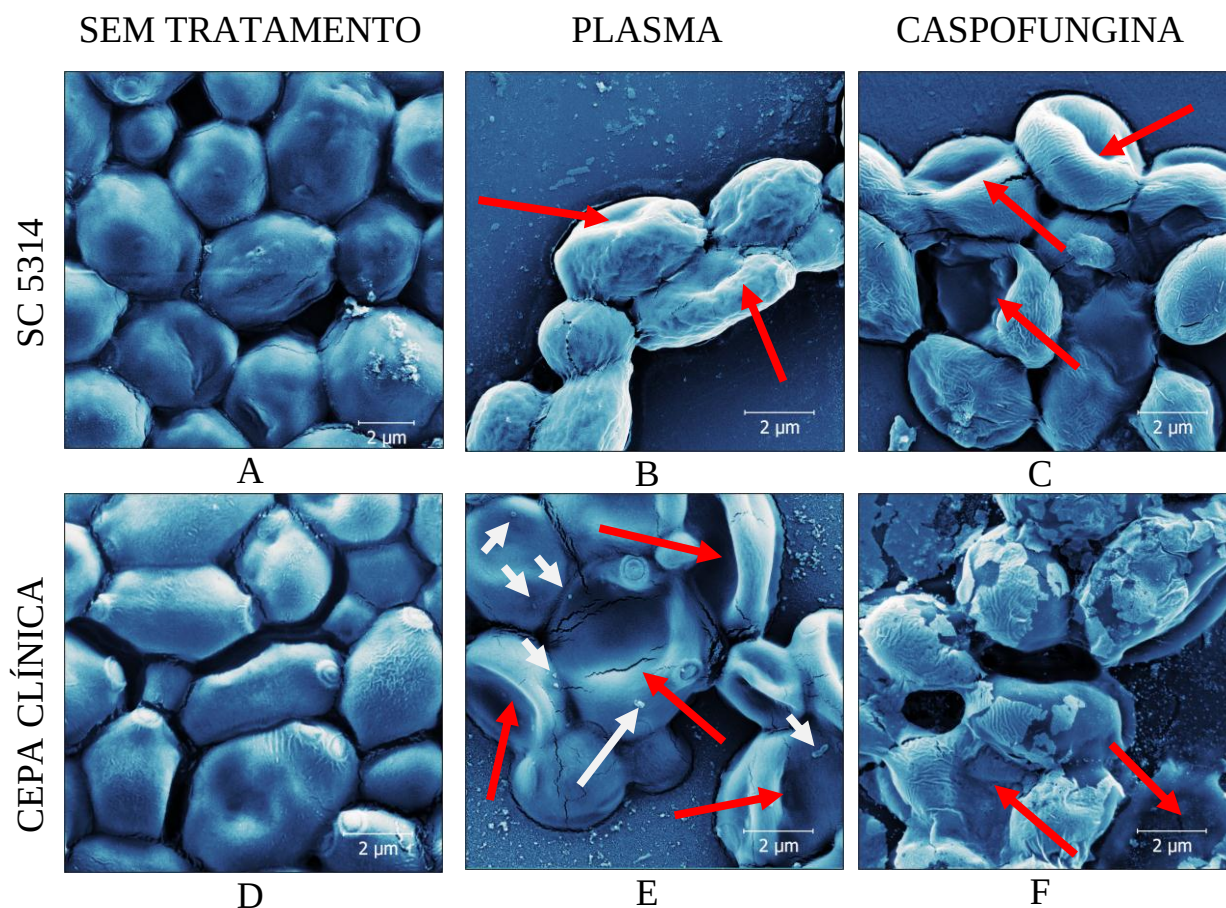
Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Análise morfológica de *Candida albicans* por microscopia de eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 15A e 15D) revelaram que as células dos grupos controles (referência e clínica), são sutilmente alongadas e após a exposição ao jato de plasma (Figura 15 B e 15E) e tratamento com caspofungina (Figura 15C e 15F) sofreram alterações morfológicas perceptíveis, como o desentumecimento, indicado pelas setas vermelhas.

Observou-se também, sobre a superfície das células da cepa clínica, a presença de pequenos grânulos, indicados pelas setas brancas (Figura 15E e Figura 16E).

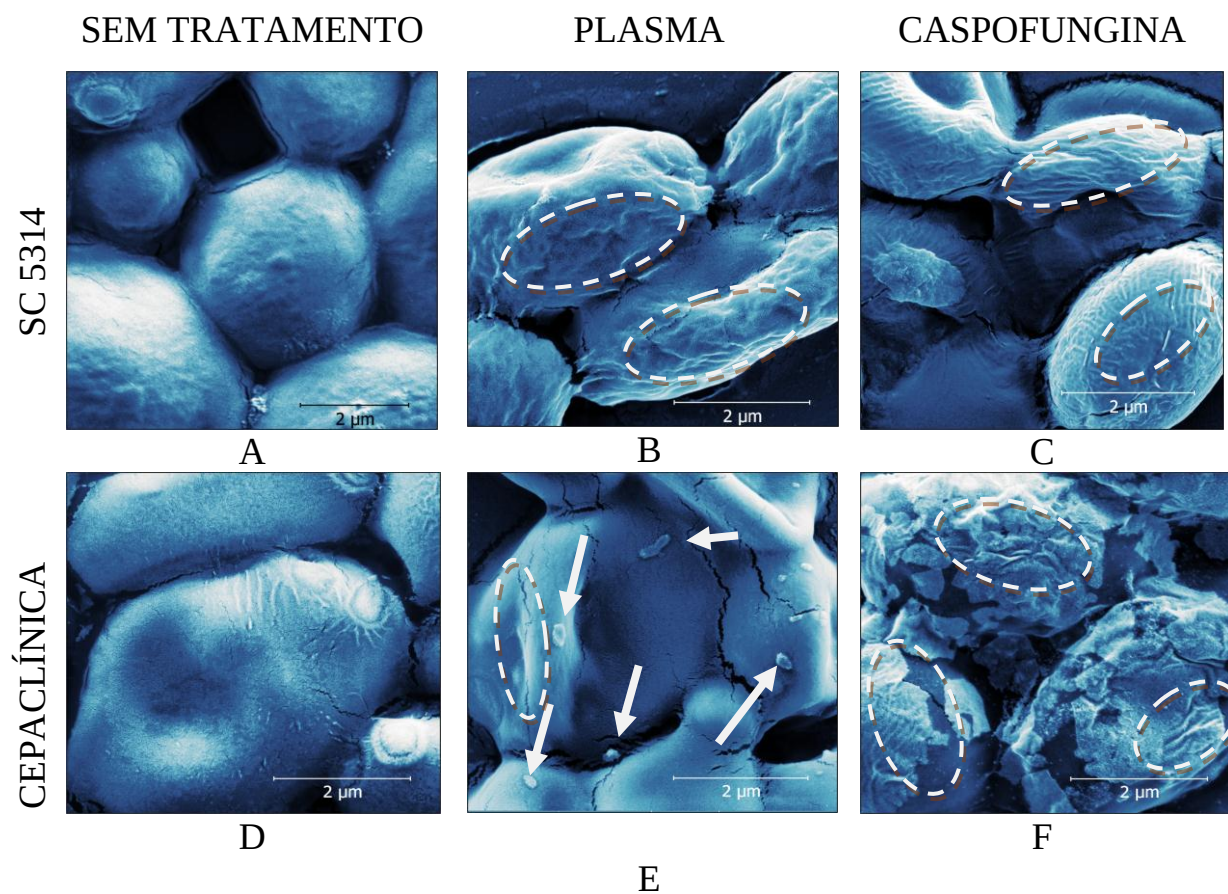
Figura 15 - Micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura, com ampliação de 25.000x, da cepa referência e clínica



Legenda: A e D) sem tratamento; B e E) plasma e; C e F) caspofungina.
Fonte: Elaborado pela autora.

Nas micrografias dos grupos expostos ao plasma (Figura 16B e 16E) e tratados com caspofungina (Figura 16C e 16F), observaram-se modificações, sobre a superfície das células, como o aparecimento de pequenas ondulações circuladas por elipses brancas tracejadas.

Figura 16 - Micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura, com ampliação de 50.000x, da cepa referência e clínica

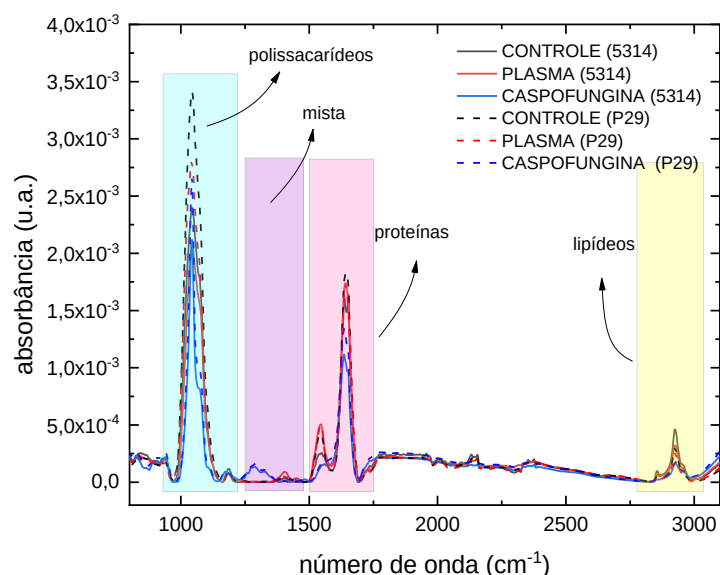


Legenda: A e D) sem tratamento; B e E) plasma e; C e F) caspofungina.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Análise celular bioquímica por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

A análise espectroscópica (Figura 17) revelou uma composição bioquímica da parede celular, representada por polissacarídeos na região de 960 a 1110 cm^{-1} (retângulo azul), seguida de proteínas na região de 1500 a 1750 cm^{-1} (retângulo rosa), precedida pelos lipídeos entre 3280 a 387330 cm^{-1} (retângulo amarelo). A região destacada no retângulo roxo, entre 1200 e 1500 cm^{-1} é uma região denominada como mista, pois diferentes compostos absorvem nesta região, como lipídeos, polissacarídeos e proteínas.

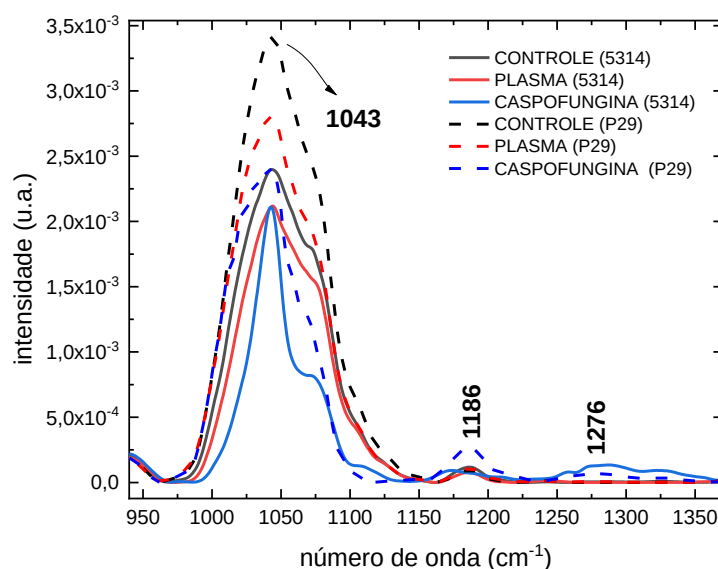
Figura 17 - Espectro de *Candida albicans* SC 5314 e cepa clínica na região de 800 a 3100 cm^{-1}



Fonte: Elaborado pela autora.

Para analisar as diferenças e semelhanças entre os grupos e as cepas, ampliou-se a região dos polissacarídeos, e pode-se observar, na Figura 18 que o grupo controle (preto) em ambas as cepas apresentou a maior intensidade, na banda centralizada em 1043 cm^{-1} , esta está relacionada ao glicogênio e as mananas (Adt et al., 2006), todavia observou-se que a intensidade das bandas decaí proporcionalmente em relação ao controle, nos grupos expostos ao plasma (25,6% e 30,5%) e tratados com caspofungina (64,2% e 70,4%), para a cepa referência e clínica respectivamente. Independente desta redução, este grupo funcional continua como constituinte majoritário das células, como mostra a Figura 20 (A e B). As bandas centralizadas em 1186 cm^{-1} (ésteres) e 1284 cm^{-1} (amida III) não apresentaram diferença entre o grupo controle e o plasma.

Figura 18 - Espectro de *Candida albicans* SC 5314 e cepa clínica na região de com ampliação da região de absorção dos polissacarídeos ($970\text{ a }1170\text{ cm}^{-1}$)



Fonte: Elaborado pela autora.

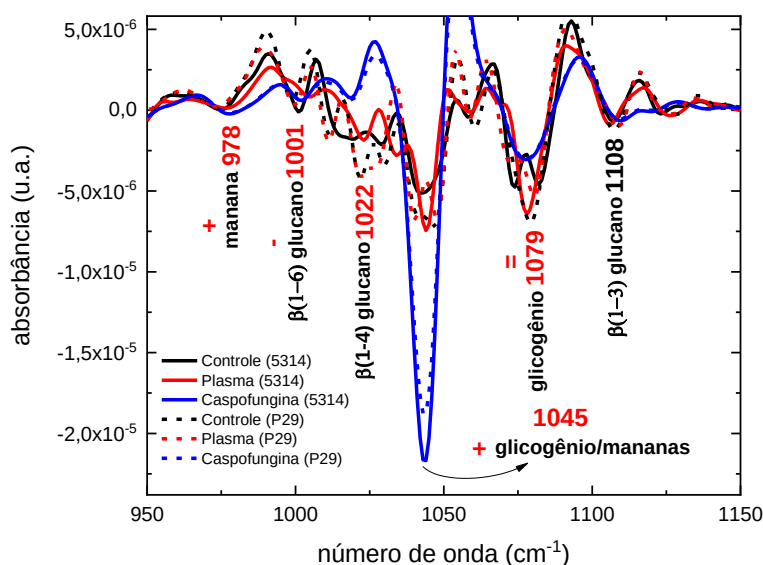
Analizou-se também, o espectro de segunda derivada desta região, e

observou-se na Figura 19, a presença de seis bandas, relacionadas aos polissacarídeos constituintes da parede celular.

As bandas centralizadas em 1001 cm^{-1} referente ao $(\beta(1\rightarrow6)\text{glucano})$ (Adt et al., 2006), 1022 cm^{-1} ($\beta(1-4)\text{glucano})$ (Shi et al., 2018) e sofreram uma leve redução em suas intensidades em ambas as cepas nos grupos plasma e caspofungina. Houve um aumento da intensidade das bandas referentes as mananas centralizadas em 978 cm^{-1} e 1045 cm^{-1} (Adt et al., 2006; Shi et al., 2018) para os grupos tratados com caspofungina e plasma em relação ao controle em ambas as cepas.

A banda em 1108 cm^{-1} ($\beta(1\rightarrow3)\text{glucano})$ e 1079 cm^{-1} (glicogênio) (Adt et al., 2006; Quiles et al., 2017; Shi et al., 2018) do grupo tratado com plasma não apresentou modificações na intensidade em relação ao controle, todavia a caspofungina apresentou uma leve redução na intensidade nestas duas bandas em relação ao grupo controle em ambas as cepas.

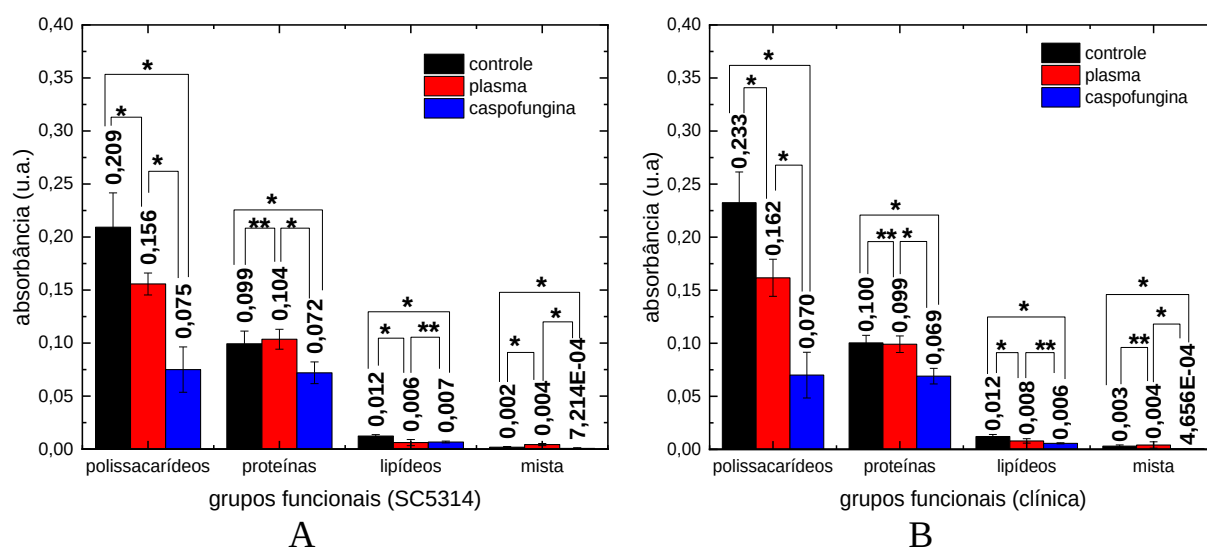
Figura 19 - Espectro de segunda derivada de *Candida albicans* SC 5314 e cepa clínica na região de com ampliação da região de absorção dos polissacarídeos ($970\text{ a }1170\text{ cm}^{-1}$)



Fonte: Elaborado pela autora.

Outra região que apresentou modificações, tanto visuais (Figura 21), quanto estatísticas foi a região mista (Figura 20), as soma das áreas das bandas centralizadas em 1404 cm^{-1} e 1454 cm^{-1} revelaram na cepa referência(SC5314) um aumento de 28,1% nesta região no grupo exposto ao plasma e de 78,5% ao da caspofungina. Para a cepa clínica, o grupo exposto ao plasma teve a média sutilmente superior à do controle, todavia não houve diferença estatística significativa, e estes dois grupos, foram diferentes da caspofungina, que apresentou uma redução na intensidade desta banda.

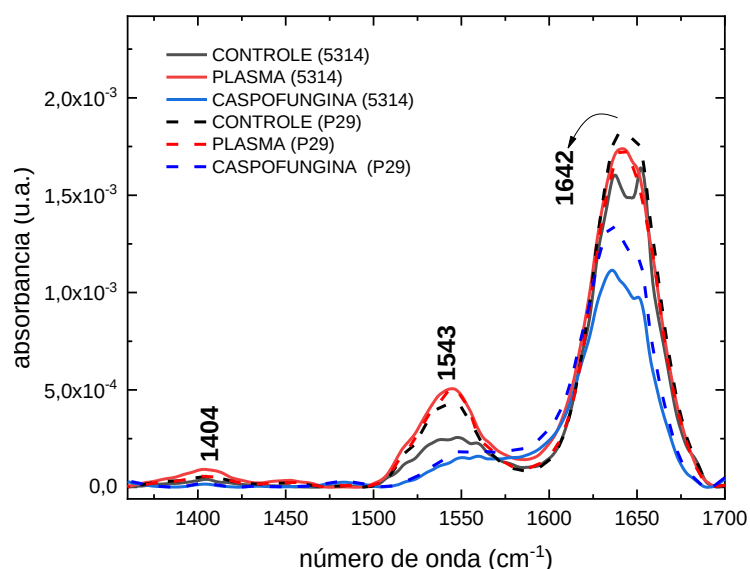
Figura 20 - Gráfico comparativo entre as razões das áreas funcionais



Legenda: Gráficos com comparação entre grupos das áreas dos grupos funcionais bioquímicos: A) cepa referência SC5314 e; B) cepa clínica, onde (*) houve diferença estatística ($p < 0,05$) e (**) não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 21 - Espectro de *Candida albicans* SC 5314 e cepa clínica na região de com ampliação da região de absorção da região mista e proteica (1360 a 1700 cm^{-1}).

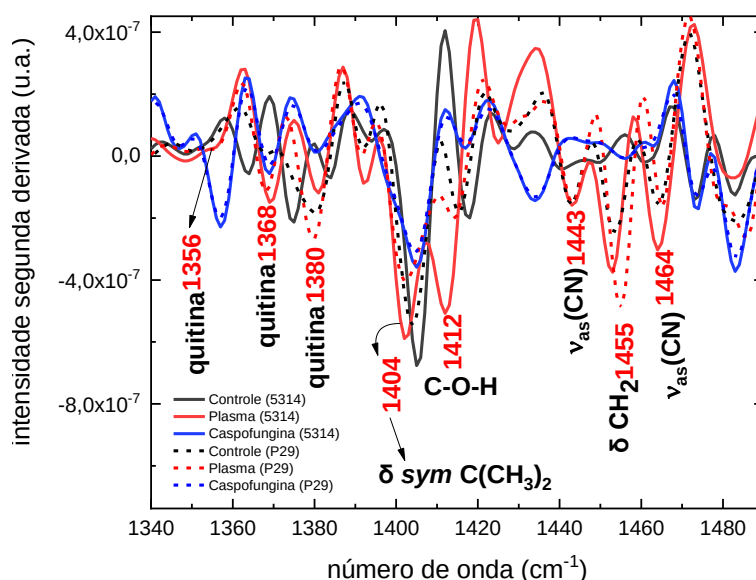


Fonte: Elaborado pela autora.

O espectro de segunda derivada (Figura 22), da região mista, revelou bandas relacionadas a quitina (1356 cm^{-1} , 1368 cm^{-1} e 1380 cm^{-1}) (Quiles et al., 2017) com intensidades maiores nos grupos de caspofungina e plasma, quando comparados ao controle.

As bandas em 1404 cm^{-1} ($\delta\text{ sym C}(\text{CH}_3)_2$) está relacionada a proteínas, carboidratos e lipídeos, assim como a banda em 1455 cm^{-1} ($\delta\text{ CH}_2$) à lipídeos (Shi et al., 2018) e proteínas, estas bandas apresentaram intensidades, no grupo tratado como plasma, superiores ao controle e ao da caspofungina. O mesmo comportamento foi observado nas bandas 1412 cm^{-1} (C-O-H), 1443 cm^{-1} e 1464 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{CN}$) estão relacionadas a modos vibracionais proteicos (Rich et al., 2016).

Figura 22 - Espectro de segunda derivada de *Candida albicans* SC 5314 e cepa clínica na região de com ampliação da região de absorção dos polissacarídeos (1340 a 1490 cm^{-1})



Fonte: Elaborado pela autora.

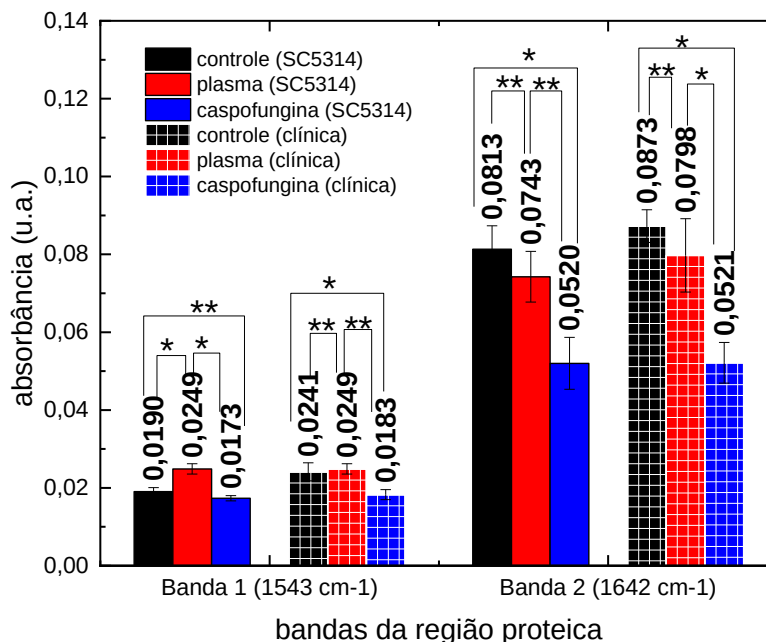
Observou-se na Figura 21, que a cepa referência (SC5314), aumentou a intensidade da banda centralizada em 1543 cm^{-1} (amida II) (Adt et al., 2006) em 23% no grupo plasma em relação ao controle, e isto aplicou-se também à cepa clínica, um aumento de 3%, porém, neste último caso não houve diferença estatística. O aumento desta intensidade no grupo plasma, está relacionado as bandas de absorção de amida II (1543 cm^{-1}) e quitina (1556 cm^{-1}), como mostra o espectro de segunda derivada (Figura 24), estas mesmas bandas, foram as responsáveis pela redução da área total da banda, em 9% para a cepa referência e 27% para a cepa clínica em relação ao grupo controle.

A área do segundo pico observado na região de absorção de proteínas (Figura 21), centralizado em 1642 cm^{-1} (amida I) (Adt et al., 2006), foi comparada entre os grupos, houve uma redução no grupo plasma em relação ao

controle, para a cepa referência (8,7%) e a clínica (8,5%), contudo, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Observou-se uma redução significativa para o grupo da caspofungina, de 30% e 40,3% para as cepas SC5314 e clínica respectivamente (Figura 23).

Observou-se que esta redução das áreas nos grupos caspofungina e plasma, está relacionada a redução da intensidade de absorção dos picos de amida II (1637 cm^{-1} e 1642 cm^{-1}), como mostra a Figura 24. Ainda na Figura 24, observou-se um padrão diferente em um único pico, o da quitina (1560 cm^{-1}), onde houve um aumento da intensidade no grupo plasma em ambas as cepas.

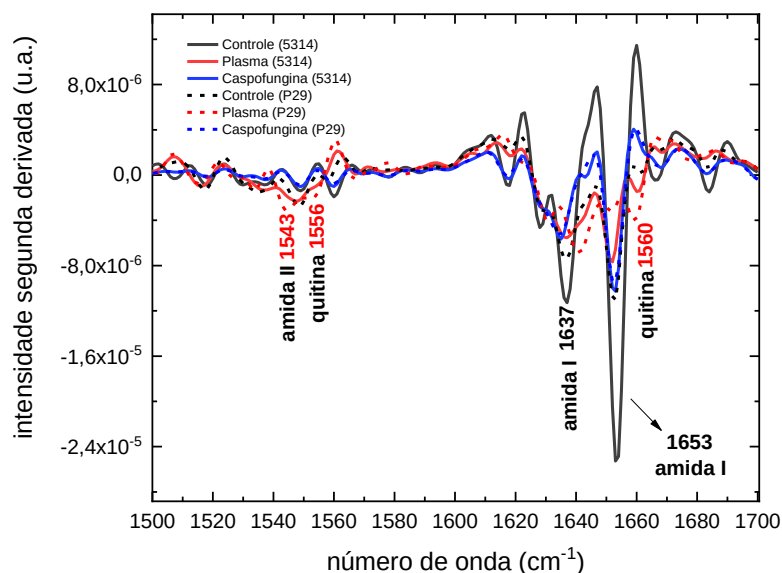
Figura 23 - Gráfico comparativo entre as áreas das bandas proteicas nos grupos tratados com plasma e caspofungina em relação ao controle não tratado



Legenda: Gráficos com comparação das áreas das bandas da área proteica, onde (*) houve diferença estatística ($p < 0,05$) e (**) não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

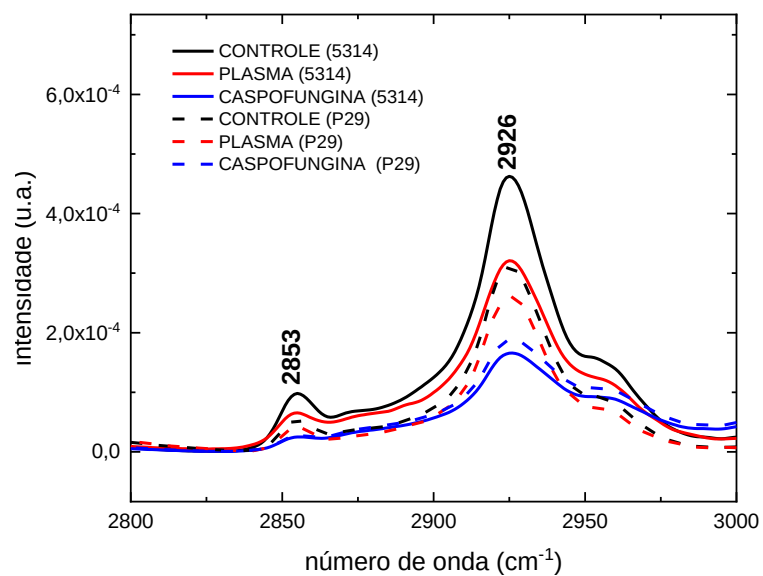
Figura 24 - Espectro de segunda derivada de *Candida albicans* SC 4314 e cepa clínica na região de com ampliação da região de absorção das proteínas (1500 a 1700 cm^{-1})



Fonte: Elaborado pela autora.

Observou-se na Figura 25, região de absorção de lipídeos, que as bandas 2853 cm^{-1} ($\nu_s\text{CH}_2$ de lipídeos) e 2926 cm^{-1} ($\nu_{as}\text{CH}_2$ de lipídeos) (Adt et al., 2006) tiveram uma redução na intensidade de absorção no grupo plasma e caspofungina. Para o grupo plasma, a soma da área das duas bandas, apresentou uma redução em relação ao controle, em 47,1% e 49,9% para as cepas referência e clínica, e, estatisticamente, estes foram iguais aos grupos da caspofungina.

Figura 25 - Espectro de *Candida albicans* SC 5314 e cepa clínica na região de com ampliação da região de absorção dos lipídeos (2800 a 3000 cm^{-1})



Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

Os estudos preliminares de Borges (2016) e Borges et al. (2017), observaram que o jato de plasma com os parâmetros utilizados neste estudo mostraram ação sobre células leveduriformes de *C. albicans*, tanto para a cepa referência quanto para a cepa clínica. Todavia, o protocolo de exposição ao jato de plasma com lâminas e posterior análise de viabilidade celular foi diferente do utilizado anteriormente pelos autores citados. O protocolo teve que ser alterado, devido às especificações e sensibilidade das técnicas analíticas utilizadas (AFM e FTIR), para isto, foi necessária a adaptação dos ensaios em lâminas, com alíquotas de inóculos em volume e concentrações específicas. Após adaptação do experimento, a observação da redução significativa das contagens de colônia entre os grupos controle e tratado com plasma, para ambas as cepas (clínica e referência) avaliadas, confirmou o efeito do plasma nessas novas condições e permitiu o desenvolvimento das análises microscópicas e bioquímicas.

Estudos preliminares de diferentes autores (Chiodi Borges et al., 2017; Delben et al., 2016; Handorf et al., 2018b; Paw et al., 2017) observaram a ação do jato de plasma sobre a viabilidade celular de *C. albicans*, contudo o mecanismo de ação do plasma sobre estas células continua ainda sem elucidação.

Após a exposição ao jato de plasma notou-se, que as células, tiveram alterações morfológicas visíveis e mensuráveis, houve uma diminuição no comprimento (eixo transversal), assim como nas alturas das células. Handorf et al. (2019) também mensuraram o tamanho das células com microscopia de força atômica, e visualizaram redução significativa no tamanho das células após, tratamento com plasma.

Handorf et al. (2018a), em um estudo anterior utilizaram AFM, e as micrografias demonstraram diferença entre o grupo controle, não tratado em

relação ao tratado com plasma, que apresentou células de *C. albicans* SC 5314 com danos na integridade da membrana e perda de material intracelular após 120 s de tratamento, tempo semelhante ao utilizado neste estudo.

O grupo tratado com caspofungina também teve redução no tamanho (eixo longitudinal e transversal) e altura das células. Esta redução do volume celular pode estar associada à perda de líquidos, uma vez que, sabe-se que a parede celular é responsável pelo controle osmótico da célula, e são os β -(1,3)-glucano, que compõe de 30-60% da parede celular, os responsáveis pela manutenção da integridade e força da parede celular (Patil e Majumda, 2017). Como o fármaco atua sobre a biossíntese destes, há favorecimento do aumento da permeabilidade da parede celular e da ruptura celular devido à pressão osmótica (Patil e Majumda, 2017).

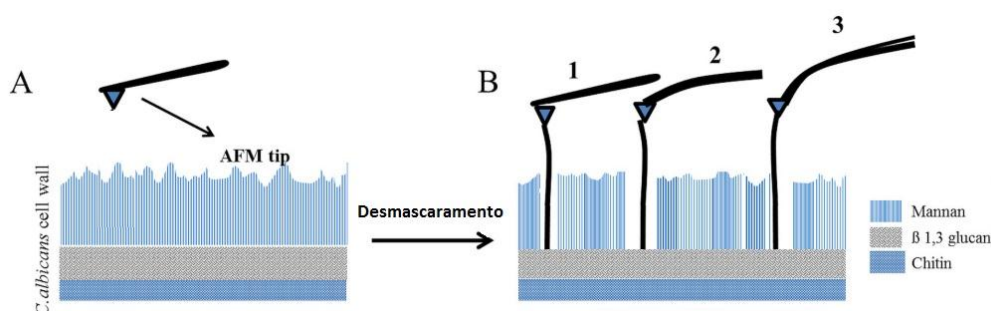
No estudo de Quiles et al. (2017), avaliando a concentração de $0,06 \mu\text{g/ml}^{-1}$ de caspofungina, foram observadas alterações morfológicas (desintumescimento) e aumento de ondulações sobre a superfície celular. Essas alterações foram bem semelhantes as encontradas neste estudo, tanto para o grupo tratado com caspofungina quanto para o tratado com plasma.

A microscopia de força atômica revelou alteração nos parâmetros topográficos da superfície celular, onde as células do grupo controle apresentam superfícies menos irregulares do que a das células dos grupos com tratamento (plasma e caspofungina), onde houve aumento expressivo da rugosidade. Segundo El-Kirat-Chatel et al. (2013) a menor rugosidade da superfície celular no grupo controle deve-se à presença das manoproteínas na camada externa da parede celular fúngica.

Resultados semelhantes ao deste trabalho foram observados em estudo anterior (Hasim et al., 2017) ao analisar alterações topográficas sobre a superfície de células de *Candida albicans* SC5314 tratadas com caspofungina. Após o tratamento com o fármaco, foi observado que a rugosidade quadrática

média (RMS) das células tratadas com o antifúngico aumentou significativamente em relação às não tratadas. Esses autores atribuíram o aumento da rugosidade ao fenômeno de desmascaramento (*unmasking*) da parede celular (Figura 26), que é a remoção ou alteração da camada de manoproteínas, expondo a camada de $(\beta\text{-(1,3)-glucano})$, que fica na camada interior da parede celular.

Figura 26 - Fenômeno de desmascaramento da parede celular



Legenda: Representação esquemática da sonda de varredura do microscópio de força atômica sobre a superfície da parede celular fúngica: A) parede celular íntegra e; B) parede celular após o desmascaramento, expondo o esqueleto glucano-quitina à detecção da sonda de varredura.

Fonte: adaptado pela autora de (Hasim et al., 2017).

Os resultados deste trabalho são similares aos de Hasim et al. (2017), o grupo tratado com caspofungina e plasma apresentaram semelhança estatística, houve um aumento da rugosidade em relação ao grupo controle, tanto para o parâmetro Ra quanto para o Rz.

El-Kirat-Chatel et al. (2013) e Formosa et al. (2013) também observaram que após a exposição à caspofungina a topografia da célula é afetada com o aumento da rugosidade e, assim como, Hasim et al. (2017), eles observaram que o aumento da rugosidade é proporcional à perda de elasticidade da célula.

Ainda que as alterações morfológicas e topográficas sofridas pelas células tratadas com o plasma sejam semelhantes às das células tratadas com caspofungina, e que, estes dados corroborem os estudos descritos na literatura (El-Kirat-Chatel et al., 2013; Formosa et al., 2013; Hasim et al., 2017; Quiles et al., 2017), a análise microscópica isolada, não é suficiente para confirmar que o alvo celular de ação do plasma é o mesmo que o da caspofungina.

Diferentes estudos revelaram que após a ação de drogas antifúngicas, há modificações morfológicas e topográficas como aumento da rugosidade, em células de *C. albicans*.

Tøndervik et al. (2014) avaliaram aumento da rugosidade (Ra) após tratamento de *C. albicans* com fluconazol. Kim et al. (2011) observou que após a exposição das células fúngicas aos antifúngicos anfotericina e flucitosina, a rugosidade das superfícies celulares aumenta ao longo do tempo de exposição ao fármaco. A anfotericina apresenta um perfil mais elevado, contudo, após a ruptura da membrana celular, a rugosidade é elevada e igual entre os dois grupos. Neste estudo as alterações morfológicas encontradas foram diferentes entre os fármacos e ajudaram na compreensão do mecanismo de ação destes antifúngicos. Maslyk et al. (2019) também observou elevação da rugosidade após a ação da anfotericina, estes autores também observaram alterações na altura das células utilizando o perfil, para identificar alterações morfológicas, assim como foi realizado neste trabalho.

Estes trabalhos supracitados mostram que, a análise, com o AFM, auxilia na compreensão parcial da ação do plasma sobre o fungo. Para determinar um alvo celular mais específico, responsável pela ação fungistática observada pelo plasma sob 120 segundos de exposição, é necessário a associação com outra técnica.

Sabe que a atua na biossíntese do β -(1,3)-glucano (Patil, Majumda, 2017), e que após a ação do fármaco, a quantidade dos polissacarídeos

constituintes da parede celular diminuem (El-Kirat-Chatel et al., 2013; Hasim et al., 2017).

Segundo Formosa et al. (2013), ao utilizar uma concentração de caposfungina elevada (3 µg/ml), obteve-se uma redução de 50% dos glucanos e um aumento de 5 vezes do valor basal de quitina, que é em torno de 1-3% do peso seco da parede celular (Ene et al., 2015). Quiles et al. (2017) confirmaram a ação do fármaco na redução destes constituintes, assim como o aumento da quitina em análise espectroscópica por FTIR.

Foram investigadas as alterações observadas microscopicamente, ao nível bioquímico, com auxílio da técnica espectroscópica de FTIR, e notou-se que o plasma alterou o perfil da constituição da parede celular, e apresentou alterações bioquímicas similares às apresentadas após à ação da caspofungina.

Os resultados obtidos neste estudo, foram muito semelhantes aos descritos por Quiles et al. (2017) e Formosa et al. (2013), ao avaliar o comportamento bioquímico das células após o tratamento com o mesmo fármaco. Os autores observaram uma redução significativa na biossíntese de polissacarídeos, observou-se o mesmo comportamento, após o tratamento com plasma, houve uma redução de 25,6% (cepa referência) e de 30,5% (cepa clínica) em relação ao grupo controle, e a redução com o uso da caspofungina, foi ainda mais expressivo de 64,2% e 70,4% para a cepa referência e clínica respectivamente.

A análise espectral isolada dos polissacáridos, após os tratamentos (plasma e fármaco), revelou uma diminuição das bandas relacionadas aos glucanos, assim como descrito por Quiles et al. (2017). Contudo, no estudo de Quiles et al. (2017), não há citação de modificação relacionada às mananas. Já o presente estudo, observou um aumento na intensidade destas bandas para as duas cepas de *Candida albicans* analisadas.

Todavia, estudos preliminares (Formosa et al., 2013; Francois et al.,

2013) avaliaram a ação da caspofungina utilizando outros ensaios bioquímicos, e observaram um aumento na expressão da biossíntese de mananas e quitinas quando *C. albicans* é exposta ao tratamento com caspofungina, assim como foi observado no presente estudo.

Na região mista, observou-se que o tratamento com plasma assim como com a caspofungina, aumentou significativamente a síntese de quitina em ambas as cepas (clínicas e referência) em relação às células não tratadas.

A região proteica foi a única que apresentou um perfil diferente no grupo tratado com o plasma, onde houve um aumento na intensidade da banda em relação ao tratado com a caspofungina, que teve uma diminuição da intensidade das bandas, inclusive inferior a intensidade das bandas do grupo controle. O aumento da síntese proteica pode estar relacionado ao aumento da síntese de mananas, uma vez que, proteínas ligam-se e este polissacarídeos formando a rede de manoproteínas (Hasim et al., 2017). O aumento proteico pode ainda, estar associado a um fenômeno chamado de *moonlighting*, que seria uma localização proteica celular diferente da localização de origem, ou seja, proteínas citoplasmáticas, que são expressas na parede celular, com um papel de proteção contra as defesas do sistema imunológico, assim como, sobre condições ambientais adversas (estresse), todavia o mecanismo de secreção destas proteínas ainda é indefinido. Estas proteínas estão relacionadas também a fatores de virulência (Karkowska-Kuleta et al., 2019).

Karkowska-Kuleta et al. (2019) e Serrano-Fujarte et al., (2016) descreveram que sobre estresse oxidativo há uma elevação na quantidade de secreção desta classe de proteínas denominadas de *moonlighting*. Alguns autores (Medrano-Díaz et al., 2018; Ramírez-Quijas et al., 2015; Serrano-Fujarte et al., 2016) demonstraram, que sobre condições de estresse oxidativo com presença de espécies reativas de oxigênio (ROS), como é ambiente é gerado pelo plasma, com a presença de ROS (Nastuta et al., 2011; Ryan et al., 2017), poderia ser um

dos mecanismo de elevação de proteínas observado nos espectros de FTIR.

Observou-se no espectro de segunda derivada, que o plasma aumenta a intensidade dos picos de quitina na região de proteínas em ambas as cepas, este fator também poderia ter contribuído para um aumento da intensidade das bandas proteicas.

O aumento da síntese de quitina, de acordo com Quiles et al. (2017) é um mecanismo que ocorre para preservar as células contra as falhas mecânicas causadas pela redução dos β -glucanos na parede celular, que favorecem à ação da pressão osmótica.

Acredita-se que o aumento da síntese de quitina nas células tratadas com plasma, esteja relacionado também à redução dos β -glucanos, contudo, outro fator pode ter influenciado o aumento da biossíntese, o estresse oxidativo gerado pelo plasma nas células (Nastuta et al., 2011; Ryan et al., 2017). Segundo Pemmaraju et al. (2016), elevados níveis de quitina criam um potencial de resistência mecânica ou de tolerância contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo. Ao aumentar as taxas de quitina, aumentam-se a força e dureza da parede celular, mantendo assim a sua integridade.

Os lipídeos constituem os menores componentes da parede celular fúngica (Herrera-Ruiz et al., 2006; Karkowska-Kuleta et al., 2019), estes lipídeos estão disposto no meio da matriz polissacarídica, e observou-se que o grupo tratado com plasma apresentou comportamento diferente do controle, todavia não observou-se diferença do grupo com caspofungina, o que sugere ação semelhante sob essas estruturas.

As análises por MEV mostraram um comportamento semelhante entre as cepas, e associando os dados de FTIR, pode-se dizer que o plasma agiu de forma equivalente sobre as células da cepa clínica.

Associando os dados morfológicos, topográficos e bioquímicos, acredita-se que a ação biológica do jato de plasma é sobre a parede celular da

Candida albicans, agindo sobre a estrutura polissacarídica, mais especificamente sobre os β -glucanos. Contudo não é possível afirmar que este seja o único alvo das espécies reativas formadas pelo plasma

Uma vez que se observa, que o plasma apresenta ação antifúngica sobre as células de *C. albicans*, a elucidação do mecanismo de ação é importante, principalmente, se o desmascaramento observado, acontecer por modulação intracelular, facilitaria a detecção destas células pelo sistema imunológico, já que, o mecanismo de ação de reconhecimento celular é mediado através da molécula de Dectin-1, uma lectina de sinalização do tipo C, que liga-se ao β -(1,3)-glucano da parede celular (Hasim et al., 2017; Okai et al., 2015).

Os estudos de Okai et al. (2015) evidenciaram que o mascaramento do β -(1,3)-glucano por mananas inibe a maturação do fagossoma do macrófago. De acordo com os resultados observados, com a possível ação sobre os glucanos de parede celular, e o conhecimento da importância deste no reconhecimento da célula fúngica pelo sistema imunológico, novos questionamentos devem ser prospectados, como investigar se o remodelamento estrutural foi consequência de um dano direto sobre estas estruturas celulares, ou se houve alguma modificação a nível molecular e intracelular que influenciou na redução da síntese das estruturas celulares dos glucanos. Sabe-se que a exposição de fármacos antifúngicos em células de *C. albicans* lidera mecanismos de remodelamento da estrutura parede celular, que influenciam a expressão dos genes de quitina, mananas e glucanos, alterando o proteoma da parede celular (Ene et al., 2015, Quijas-Ramírez et al., 2015).

6 CONCLUSÃO

Após análise dos dados, pode-se concluir que o plasma age sobre as estruturas da parede celular fúngica, mais especificamente sobre os polissacarídeos, influenciando na redução de glucanos e aumento de mananas e quitinas. Esse remodelamento da parede celular associado a outros fatores a serem estudados causaram alterações morfológicas e topográficas nas células de *Candida albicans*.

REFERÊNCIAS*

Adt I, Toubas D, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum GD. FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. *Arch Microbiol*. 2006;185(4):277–85. doi: 10.1007/s00203-006-0094-8. PMID: 16474951.

Ahmad A, Wei Y, Syed F, Tahir K, Taj R, Ullah A, et al. Microbial Pathogenesis Amphotericin B-conjugated biogenic silver nanoparticles as an innovative strategy for fungal infections. *Microb Pathog*. 2016;99:271–81. doi: 10.1016/j.micpath.2016.08.031.

Beyer R, Spettel K, Zeller I, Achleitner D, Krause R, Apfalter P, et al. Antifungal susceptibility of yeast bloodstream isolates collected during a 10-year period in Austria. *Mycoses*. 2019;62(2018):357–67. doi: 10.1111/myc.12892.

Borges AC. Atividade antifúngica e citotóxica do jato de plasma frio sob pressão atmosférica [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2016.

Borges AC, Morais GGL, Nishime TMC, Lacerda AVG, Kostov KG, Koga-Ito CY. Amplitude-modulated cold atmospheric pressure plasma jet for treatment of oral candidiasis: *In vivo* study. *PLoS One*. 2018;13(6):1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0199832.

Borges AC, Nishime TMC, Kostov KG, Morais GGL, Vidal AVG, Carvalho JNMM, et al. Cold atmospheric pressure plasma jet modulates *Candida albicans* virulence traits. *Clin Plasma Med*. 2017;7–8:9–15. doi: 10.1016/j.cpme.2017.06.002.

Chudzik B, Koselski M. A new look at the antibiotic amphotericin B effect on *Candida albicans* plasma membrane permeability and cell viability functions. *Eur Biophys J*. 2015;44:77–90. doi: 10.1007/s00249-014-1003-8.

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast M27-A3. 3th ed. Pennsylvania : Clinical and laboratory standards institute; 2008.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2019]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cordeiro RDA, Jose A, Evangelista DJ, Serpa R, Raquel A, Andrade C De, et al. Cefepime and amoxicillin increase metabolism and enhance caspofungin tolerance of *Candida albicans* biofilms 2019;10(1337):1–9. doi: 10.3389/fmicb.2019.01337.

Delben JA, Zago CE, Tyhovich N. Effect of Atmospheric-Pressure Cold Plasma on Pathogenic Oral Biofilms and *In Vitro* Reconstituted Oral Epithelium. PLoS One. 2016;11(5):1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0155427.

Doria ACOC. Estudo da ação antifúngica de um jato de plasma não-térmico de argônio e/ou ar comprimido sobre biofilmes de leveduras do gênero *Candida* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade do Vale do Paraíba (Univap), Pós-Graduação em Engenharia Biomédica; 2015.

El-Kirat-Chatel S, Beaussart A, Alsteens D, Jackson DN, Lipke PN, Dufrene YF. Nanoscale analysis of caspofungin-induced cell surface remodelling in *Candida albicans*. Nanoscale. 2013;5(3):1105–15. doi: 10.1039/c2nr33215a. PMID: 23262781.

Ene IV, Walker LA, Schiavone M, Lee KK, Martin-yken H, Dague E. Cell Wall Remodeling Enzymes Modulate Fungal Cell Wall Elasticity and Osmotic Stress Resistance. mBio. 2015;6(4):1–15. doi: 10.1128/mBio.00986-15.

Formosa C, Schiavone M, Martin-Yken H, François JM, Duval RE, Dague E. Nanoscale effects of caspofungin against two yeast species, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(8):3498–506. doi: 10.1128/AAC.00105-13. PMID: 23669379.

Franco OL, Parachin NS, Monteiro CA, Br CM, Moffa EB, Terças ALG, et al. Antifungal drug susceptibility of candida species isolated from HIV-positive patients recruited at a public hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. Front Microbiol. 2017(8):298. doi: 10.3389/fmicb.2017.00298.

Francois JM, Formosa C, Schiavone M, Pillet F, Martin-Yken H, Dague E. Use of atomic force microscopy (AFM) to explore cell wall properties and response to stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet. 2013;59(4):187–96. doi: 10.1007/s00294-013-0411-0. PMID: 24071902.

Handorf O, Schnabel U, Bekeschus S, Riedel K, Graf AC. Antimicrobial effects of microwave-induced plasma torch (MiniMIP) treatment on *Candida albicans* biofilms. Microb Biotechnol. 2019;00:1–15. doi: 10.1111/1751-7915.13459.

Handorf O, Weihe T, Bekeschus S, Graf AC, Schnabel U, Riedel K, et al. crossm Nonthermal Plasma Jet Treatment Negatively Affects the Viability and Structure of *Candida albicans* SC5314 Biofilms. *Appl Env Microbiol*. 2018a;84(21):1–15.

Hasim S, Allison DP, Retterer ST, Hopke A, Wheeler RT, Doktycz MJ, et al. crossm *Candida albicans* Mutants Correlates with Increases in Cell Wall Surface Roughness and Decreases in Cell Wall. *Infect Immun*. 2017;85(1):1–13.

Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008;51(4):2–15.

Heaselgrave W, Shama G, Andrew PW, Kong G. Inactivation of *Acanthamoeba* spp. and Other Ocular Pathogens by Application of Cold Atmospheric Gas Plasma. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(10):3143–8. doi: 10.1128/AEM.03863-15.

Herrera-Ruiz J, Elorza V, Valetín E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res*. 2006;6:14–29. doi: 10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x.

Jayatilake JAMS, Samaranayake LP. Experimental superficial candidiasis on tissue models: Review article. *Mycoses*. 2010;53(4):285–95. doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01879.x. PMID: 20406388.

Karkowska-kuleta J, Satala D, Bochenska O, Rapala-kozik M, Kozik A. Moonlighting proteins are variably exposed at the cell surfaces of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* under certain growth conditions. *BMC Microbiol*. 2019;19(149):1–13. doi: <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1524-5> (2019).

Kim KS, Kim YS, Han I, Kim MH, Jung MH, Park HK. Quantitative and qualitative analyses of the cell death process in *Candida albicans* treated by antifungal agents. *PLoS One*. 2011;6(12):1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0028176. PMID: 22174777.

Kim YJ, Kim S Il, Choi JY, Yoon SK, Na GH, You YK, et al. Invasive fungal infection in liver transplant recipients in a prophylactic era. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(26):1–7.

Kosalec I, Bobnjari I, Jug M, Vlaine T, Vlaine J. Membrane of *Candida albicans*

as a target of berberine. BMC Complement Altern Med. 2017;17(268):1–10. doi: 10.1186/s12906-017-1773-5.

Kostov KG, Borges AC, Koga-Ito CY, Nishime TMC, Prysiashnyi V, Honda RY. Inactivation of *Candida albicans* by Cold Atmospheric Pressure Plasma Jet. IEEE Trans Plasma Sci. 2015;43(3):770–5. doi: 10.1109/TPS.2014.2360645.

Machado GRM, Pippi B, Flores D, Lana D, Amaral PS, Teixeira ML, et al. Reversal of fluconazole resistance induced by a synergistic effect with *Acca sellowiana* in *Candida glabrata* strains. Pharm Biol. 2016;54(11):2410–9. doi: 10.3109/13880209.2016.1158286.

Masłyk M, Janeczko M, Martyna A, Czernik S, Tokarska-rodak M, Chwedczuk M, et al. The Anti- *Candida albicans* Agent 4-AN Inhibits. Molecules. 2019;24(153):1–12. doi: 10.3390/molecules24010153.

Medrano-Díaz C, Vega-González A, Ruiz-baca E, Moreno A, Cuéllar-Cruz M. Microbial Pathogenesis Moonlighting proteins induce protection in a mouse model against *Candida* species. Microb Pathogenes. 2018;124:21–9. doi: 10.1016/j.micpath.2018.08.024.

Miles BYAA, Misra SS. The estimation of the bactericidal power of the blood. J Hyg (Lond). 1931;38(6):732–49. doi: 10.1017/S002217240001158X. PMID: 20475467.

Mohd Nasir N, Lee BK, Yap SS, Thong KL, Yap SL. Cold plasma inactivation of chronic wound bacteria. Arch Biochem Biophys. 2016;605:76–85. doi: 10.1016/j.abb.2016.03.033. PMID: 27046340.

Nastuta AV, Topala I, Grigoras C, Pohoata V, Popa G. Stimulation of wound healing by helium atmospheric pressure plasma treatment. J Phys D Appl Phys. 2011;44(10):105204. doi: 10.1088/0022-3727/44/10/105204.

Nishime TMC, Borges AC, Koga-ito CY, Machida M, Hein LRO, Kostov KG. Surface & Coatings Technology Non-thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. Surf Coat Technol. 2017;312:19–24. doi: 10.1016/j.surfcoat.2016.07.076.

Nishime TMC, Borges AC, Koga-Ito CY, Machida M, Hein LRO, Kostov KG. Non-thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. Surf Coatings Technol. 2017;312:19–24. doi: 10.1016/j.surfcoat.2016.07.076.

Okai B, Lyall N, Gow N a R, Bain JM, Erwig LP. Rab14 regulates maturation of macrophage phagosomes containing the fungal pathogen *Candida albicans* and outcome of the host-pathogen interaction. *Infect Immun*. 2015;83(4):1523–35. doi: 10.1128/IAI.02917-14. PMID: 25644001.

Patil A, Majumda S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. *J Pharm Pharmacol*. 2017;69:1635–60. doi: 10.1111/jphp.12780.

Paw J, Kwiatkowski M, Terebun P, Chudzik B, Ć MG, Treatment AP. *Candida albicans* inactivation with DBD He / O₂ plasma jet. *IEEE*. 2017:1–4.

Pemmaraju SC, Padmapriya K, Pruthi PA, Prasad R. Impact of oxidative and osmotic stresses on *Candida albicans* biofilm formation. *Biofouling*. 2016;7014(32):8. doi: 10.1080/08927014.2016.1212021.

Prasad R, Nair R, Banerjee A. Multidrug transporters of *Candida* species in clinical azole resistance. *Fungal Genet Biol*. 2019;132(103252):1–8. doi: 10.1016/j.fgb.2019.103252.

Quiles F, Accoceberry I, Couzigou C, Francius G, Noel T, El-Kirat-Chatel S. AFM combined to ATR-FTIR reveals *Candida* cell wall changes under caspofungin treatment. *Nanoscale*. 2017:13731–8. doi: 10.1039/C7NR02170D. PMID: 28884772.

Ramírez-Quijas M, López-Romero, Cuéllar-Cruz M. Microbial Pathogenesis Proteomic analysis of cell wall in four pathogenic species of *Candida* exposed to oxidative stress. *Microb Pathog*. 2015;87:1–12. doi: 10.1016/j.micpath.2015.07.011.

Ramos-e-Silva M, Lima CMO, Schechtman RC, Trope BM, Carneiro S. Systemic mycoses in immunodepressed patients (AIDS). *Clin Dermatol*. 2012;30(6):616–27. doi: 10.1016/j.clindermatol.2012.01.008. PMID: 20347666.

Rich PR, Oliver K V, Mare A. Effects of the Hydration State on the Mid-Infrared Spectra of Urea and Creatinine in Relation to Urine Analyses. *Appl Spectrosc*. 2016;70(6):983–94. doi: 10.1177/0003702816641263.

Rodrigues LS, Motta FA, Picharski GL, Riccieri MC, Dalla-Costa LM. Invasive candidiasis. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(23(e15933)):1–6. doi: 10.1097/MD.00000000000015933.

de la Rosa-García, Miramontes-Zapata M, Sánchez-Vargas LO, Mondragón-Padilla A. Oral colonisation and infection by *Candida sp.* in diabetic and non-diabetic patients with chronic kidney disease on dialysis. *Nefrologia*. 2013;33(6):764–70. doi: 10.3265/Nefrologia.pre2013.Aug.11790. PMID: 24241363.

Ryan TP, Stalder KR, Woloszko J, Ryan TP, Stalder KR, Woloszko J, et al. Antimicrobial outcomes in plasma medicine Thomas. *Proc Spie*. 2017;9326(2015):1–24. doi: 10.1117/12.2082741.

Serrano-Fujarte I, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M. Microbial Pathogenesis Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. *Microb Pathog*. 2016;90:22–33. doi: 10.1016/j.micpath.2015.10.001.

Shi Q, Câmara CRS, Schlegel V. Biochemical alterations of *Candida albicans* during the phenotypic transition from yeast to hyphae captured by Fourier transform mid-infrared-attenuated reflectance spectroscopy. *Analyst*. 2018;143:5404–16. doi: 10.1039/c8an01452c.

Silva IF. Caracterização e identificação rápida de bactérias em culturas puras e mistas por microespectroscopia FT-IR [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade do Vale do Paraíba(Univap), Pós-Graduação em Engenharia Biomédica; 2010.

Takeda S, Yamada S, Hattori N, Nakamura K, Tanaka H, Kajiyama H, et al. Intraperitoneal Administration of Plasma-Activated Medium: Proposal of a Novel Treatment Option for Peritoneal Metastasis From Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2017;24:1188–94. doi: 10.1245/s10434-016-5759-1. PMID: 28058557.

Tøndervik A, Sletta H, Klinkenberg G, Emanuel C, Powell LC, Pritchard MF, et al. Alginate oligosaccharides inhibit fungal cell growth and potentiate the activity of antifungals against *Candida* and *Aspergillus spp.* *PLoS One*. 2014;9(11):10. doi: 10.1371/journal.pone.0112518. PMID: 25409186.

Varade RS, Burkemper N. Cutaneous fungal infections in the Elderly. *Clin Geriatr Med*. 2013;29(2):461–78. doi: 10.1016/j.cger.2013.01.001.