

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/05/2022.



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

LADY DAIANE PEREIRA LEITE

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE
PLASMA FRIO EM PRESSÃO ATMOSFÉRICA E
ANTIFÚNGICOS POLIÊNICOS CONVENCIONAIS SOBRE
BIOFILMES DE *Candida albicans***

2020

LADY DAIANE PEREIRA LEITE

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE PLASMA
FRIO EM PRESSÃO ATMOSFÉRICA E ANTIFÚNGICOS
POLIÊNICOS CONVENCIONAIS SOBRE BIOFILMES DE *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 e Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico odontológico.

Orientadora: Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. 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).

Leite, Lady Daiane Pereira

Atividade antifúngica da associação entre plasma frio em pressão atmosférica e antifúngicos poliênicos convencionais sobre biofilmes de *Candida albicans* / Lady Daiane Pereira Leite. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.

49 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, 2020.

Orientadora: Cristiane Yumi Koga-ito.

1. *Candida albicans*. 2. Candidose. 3. Antifúngicos. 4. Plasma frio. I. Koga-ito, Cristiane Yumi, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Tit. Janete Dias Almeida

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Gabriela de Moraes Gouvêa Lima

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 07 de maio de 2020.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia – UNESP e ao Programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado através do processo nº: 88882434282/2019-01, no período de 01/06/2019 a 30/04/2020.

À minha orientadora Cristiane Yumi Koga-Ito, pela oportunidade, ensinamentos, paciência e principalmente por todo o carinho e atenção que foram fundamentais nos momentos em que acreditava que não era capaz de chegar até aqui.

À minha família, pelo apoio e incentivo que foram fundamentais ao longo da minha formação e principalmente durante o mestrado.

E por fim, agradeço a toda equipe (amigos) do laboratório de genoma pelos ensinamentos, convivência e bons momentos vividos durante esta fase e do qual tenho o imenso orgulho em fazer parte.

“Inteligência é a habilidade de se adaptar às mudanças”.

Stephen Hawking

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	16
2.1 Objetivo geral	16
2.1.1 Objetivos específicos	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Cepas e condições de crescimento.....	17
3.2 Jato de plasma frio sob pressão atmosférica	17
3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos fármacos nistatina e anfotericina B.....	18
3.4 Formação dos biofilmes e determinação da concentração/condição anti-biofilme efetiva.....	19
3.5 Associação das condições sub-inibitórias e determinação da concentração/condição anti-biofilme efetiva.....	20
3.6 Análise dos dados	21
4 RESULTADOS.....	22
4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos fármacos nistatina e anfotericina B.....	22
4.2 Determinação das condições anti-biofilme dos antifúngicos convencionais e do jato de plasma	22
4.3 Associação das condições sub-inibitórias e determinação da concentração/condição anti-biofilme efetiva.....	25
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO	36

REFERÊNCIAS	37
ANEXO.....	47

Leite LDP. Atividade antifúngica da associação entre plasma frio em pressão atmosférica e antifúngicos poliênicos convencionais sobre biofilmes de *Candida albicans*. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

RESUMO

A crescente incidência da resistência às drogas antifúngicas tornou-se um grande desafio para áreas médica e odontológica, fazendo com que a busca por métodos de tratamento alternativos ou em combinação com as já utilizadas sejam urgentemente necessárias. O objetivo deste projeto foi avaliar os efeitos da associação entre o plasma frio em pressão atmosférica e antifúngicos poliênicos convencionais utilizados no tratamento tópico da candidose bucal. Para tanto, foram realizados: a) Determinação das concentrações inibitórias dos antifúngicos poliênicos nistatina e anfotericina B e do plasma frio em pressão atmosférica sobre biofilmes de *C. albicans*; b) Avaliação do efeito dos tratamentos isolados e associados em condições/concentrações sub-inibitórias para fins de comparação e c) Avaliação dos diferentes protocolos de aplicação dos tratamentos, visando a obtenção da condição experimental mais eficaz para o controle do biofilme fúngico. Os dados de unidades formadoras de colônia foram comparados estatisticamente entre os grupos por One-way ANOVA e post hoc Tukey, com nível de significância de 5%. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o jato de plasma apresentou efeito antifúngico similar quando aplicado isoladamente ou em associação com nistatina e anfotericina B. Ainda, foi possível concluir que o jato de plasma frio apresenta efeito antifúngico mais eficaz do que os tratamentos dos biofilmes utilizando nistatina e anfotericina B no tempo de 5 minutos.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Candidose. Antifúngicos. Plasma frio.

Leite LDP. Antifungal activity of the association between atmospheric pressure cold plasma and conventional polyene antifungals on biofilms of Candida albicans. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

The increasing incidence of antifungal resistance represents a great challenge in the medical areas and Dentistry. For this reason, the search for alternative methods or combination with the conventional ones is urgently necessary. The aim of this project is to evaluate, the effects of association between atmospheric pressure cold plasma and conventional polyene antifungals used for the treatment of oral candidiasis will be studied. With this purpose, the following methodologies were be used: a) To determine the inhibitory concentrations of the polyene antifungals nystatin and amphotericin B and cold plasma on C. albicans biofilms, b) To evaluate the combination of treatments in subinhibitory conditions, including isolated treatments for comparison purposes and c) To evaluate different protocols of treatment application, aiming to obtain the most effective protocol against fungal biofilm. Data was compared by One-way ANOVA and post hoc Tukey, with a significance level of 5%. Considering the results, it could be concluded that cold plasma showed similar effects when applied alone or in association to nystatin and amphotericin B. Cold plasma showed more effective antifungal effect on biofilms when compared to nystatin and amphotericin B, after 5 min exposure.

Keywords: Candida albicans. Candidosis. Antifungal. Cold plasma.

1 INTRODUÇÃO

A incidência das infecções fúngicas tem aumentado significativamente nas últimas décadas e atualmente tem sido considerada uma importante causa de mortalidade em todo o mundo (Mount et al., 2018). Grande parte das infecções é causada por espécies do gênero *Candida*, principalmente *Candida albicans*. Esses fungos existem como micro-organismos comensais na microbiota da cavidade bucal, na pele, assim como no trato gastrointestinal e urogenital de animais de sangue quente e na maioria dos seres humanos (Thomas et al., 2017). Do total de 200 espécies que compõem o gênero *Candida*, apenas 20 estão associadas com doenças em humanos (Akpan, Morgan, 2002; Williams et al., 2013).

Na presença de fatores predisponentes, esses fungos podem causar infecções que podem variar desde doenças muco-cutâneas superficiais até processos invasivos sistêmicos (Pappas et al., 2009). Os fatores predisponentes sistêmicos mais comuns relatados são: uso de antibióticos de amplo espectro ou agentes imunossupressores, transplantes, uso prolongado de cateteres e condições como diabetes, desnutrição severa em crianças e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Lalla et al., 2013; Patil et al., 2015). No caso da candidose bucal, os fatores de risco estão relacionados as causas endógenas (extremos de idade, gravidez, pacientes imunocomprometidos, diabetes mellitus, xerostomia e deficiências vitamínicas) e causas exógenas (desnutrição, tabagismo, uso de próteses orais inadequadas, radioterapia localizada e quimioterapia) (Ferreira et al., 2017).

As infecções fúngicas locais geralmente envolvem a pele, boca ou vagina e podem ocorrer em hospedeiros controle ou que apresentem alguns dos fatores de riscos anteriormente citados. No que se refere a *C. albicans*, as infecções bucais são extremamente comuns em pacientes imunocomprometidos (por exemplo,

pacientes HIV positivos). Em contraste, infecções vaginais podem ocorrer em indivíduos sem qualquer evidência de imunocomprometimento (Kaplan et al., 2009). As infecções sistêmicas afetam principalmente pacientes hospitalizados e, em muitas vezes, com risco de óbito (Perlroth et al., 2007; Jacobsen et al., 2012). O gênero *Candida* tem sido relatado como o quarto grupo de micro-organismos mais comumente isolados em casos de infecções sistêmicas (Pfaller, Diekema, 2010).

Taxonomicamente, o gênero *Candida* pertence à classe Blastomycetes, ordem Saccharomycetales e a família Saccharomycetaceae (Gow, Yadav, 2017; Wilson, 2019). Uma característica das espécies desse gênero é o polimorfismo, ou seja, pode se apresentar na forma de leveduras (blastoconídios) ou filamentos (hifas verdadeiras e pseudo-hifas). Como consequência, as espécies do gênero *Candida* podem diferir significativamente em termos de bioquímica, morfologia, composição genética e, principalmente, sua capacidade de causar infecções em humanos (Williams et al., 2013).

Candida albicans expressa vários fatores de virulência que são responsáveis pela sua patogenicidade. Esses fatores incluem presença de biomoléculas de reconhecimento (adesinas), morfogênese (transição entre morfologia leveduriforme e hifal) e secreção de proteases e fosfolipases (Calderone, Fonzi, 2001).

O diagnóstico de candidose bucal inclui a identificação de sinais e sintomas clínicos, presença de leveduras do gênero *Candida* ao exame direto da lesão ou biópsia, mostrando hifas penetrando o epitélio, cultura microbiológica positiva e testes sorológicos (Ellepola, Morrison, 2005; Patil et al., 2015).

A escolha da terapia antifúngica depende da natureza da lesão e do estado imunológico do paciente. Existem três alvos principais de ação das drogas antifúngicas frente a *C. albicans*: a membrana celular, a parede celular e os ácidos nucleicos (Cannon et al., 2007; Patil et al., 2015). Em relação à via de

administração, os medicamentos podem ser de uso tópico, aplicados diretamente na área da lesão, por via oral ou intravenosa, levando à ação sistêmica (Cuesta et al., 2014).

O tratamento antifúngico da candidose oral pode ser realizado topicamente ou sistemicamente, sendo que as formulações tópicas orais são as mais utilizadas. Os medicamentos de uso tópico são aplicados na lesão e tratam infecções superficiais já os medicamentos sistêmicos são prescritos quando a infecção é disseminada, não sendo suficiente o uso da terapia tópica. Os antifúngicos tópicos têm poucos efeitos adversos, porque sua absorção é muito limitada, não interagindo de forma significativa com outros medicamentos que o paciente possa estar recebendo (Quindós et al., 2018). No entanto, o sabor desagradável dos medicamentos e duração prolongada do tratamento são limitantes à aderência do paciente ao protocolo terapêutico. A crescente de resistência aos antifúngicos convencionais também é considerada um grande desafio (Goins et al., 2002; Kolb et al., 2008; Mohr et al., 2008; Pappas et al., 2009; Verki et al., 2016; Perlin et al., 2017).

Os fármacos de escolha para o tratamento da candidose bucal têm sido a nistatina em doses de 100.000 UI/ml, administrada por via tópica e a anfotericina B a 50 mg administrada por via sistêmica (Garcia-Cuesta et al., 2016). A nistatina foi o primeiro agente antifúngico relatado e está disponível em cremes tópicos e enxaguatórios bucais para tratamento de candidose cutânea e mucocutânea (Onyewu, Heitman, 2007; Rodrigues, 2014).

Por sua vez, a anfotericina B exibe atividade antifúngica de amplo espectro contra uma variedade de fungos patogênicos (Onyewu, Heitman, 2007; Rodrigues, 2014). Atualmente, a formulação tópica de anfotericina B está disponível em alguns países (Quindós et al., 2019). A Infectious Diseases Society of America- IDSA, recomendou a suspensão oral de desoxicolato de anfotericina

B como alternativa para candidose bucal refratária ao fluconazol (Pappas et al., 2016).

A eficácia do tratamento antifúngico tópico depende da penetração dos medicamentos administrados na pele. A baixa solubilidade da anfotericina B é uma das limitações mais importantes para o desenvolvimento de novas formulações principalmente para uso tópico (Torrado et al., 2008; López et al., 2018). Estudos que buscam o desenvolvimento de novas formulações de anfotericina B para aplicação tópica, tem como foco principalmente a incorporação de substâncias que possam causar o aprisionamento de medicamentos pouco solúveis em água, atuando como carreadores e melhorando sua permeabilidade (Butani et al., 2016; Sosa et al., 2017; Bastiani et al., 2019). Um estudo feito por Castilho et al. (2018), demonstrou que a incorporação de γ -ciclodextrina em formulações tópicas semi-sólidas, mostrou-se um excipiente útil para melhorar a solubilidade, permeabilidade, incluindo a atividade antifúngica da anfotericina B.

A evolução da resistência às drogas antifúngicas é preocupante, devido ao número limitado de drogas antifúngicas atualmente disponíveis (Mount et al., 2018). Nos últimos anos, o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos foi limitado, principalmente em comparação ao número de agentes disponíveis para infecções bacterianas (Butts, Krysan, 2012), existindo relatos de casos refratários aos tratamentos convencionais (Wang et al., 2015; Lyu et al., 2016; Shan et al., 2017). Considerando as limitações da terapia com antifúngicos convencionais em casos de candidoses locais ou superficiais, a busca por métodos de tratamento alternativos ou em combinação com as já utilizadas são urgentemente necessárias.

Neste contexto, surge o plasma frio em pressão atmosférica. O plasma é conhecido como o quarto estado da matéria e trata-se de uma massa de gases ionizados em alta temperatura (Chang, 1999). Os plasmas densos e de temperatura muito alta estão associados a raios, estrelas e ao sol. Em contraste, as formas de

plasma menos densas e de baixa temperatura estão inter-relacionadas com ventos e auroras solares e estelares, desta forma, o plasma pode ser classificado em dois tipos, quente e frio. Os plasmas quentes são difíceis de manipular, mas atualmente, plasmas frios têm sido produzidos *in vitro* e podem ser manipulados em temperatura ambiente e sob pressão atmosférica (Mc Combs, Darby, 2010).

Os estudos que utilizam o plasma frio, gerado à temperatura próxima à ambiente, abrangem uma diversidade imensa de aplicações potenciais, como por exemplo, o controle de micro-organismos patogênicos (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e fungos), eliminação de biofilmes microbianos e esporos bacterianos, descontaminação de superfícies e de alimentos (Laroussi et al., 2003; Abramzon et al., 2006; Kolb et al., 2008; Josh et al., 2010; Li et al., 2012; Niemira, 2012; Klämpfl et al., 2012; Sarangapani et al., 2018; Liao et al., 2018; Oliveira et al., 2019; Theinkom et al., 2019; Langner et al., 2019).

Esses efeitos biológicos promissores, associados aos relatos de baixa toxicidade ao hospedeiro (Daeschlein et al., 2012; Borges et al., 2017), têm baseado várias aplicações na área médica nos campos da dermatologia, incluindo a reparo de feridas, tratamento de doenças infecciosas e controle de neoplasias malignas (von Woedtke et al., 2013).

Estudos anteriores apontam para uma aplicação extremamente promissora do plasma frio em pressão atmosférica no tratamento de infecções superficiais causadas por leveduras do gênero *Candida*. A ação antifúngica frente a *C. albicans* e o efeito modulatório sobre fatores de virulência como adesão e filamentação também foi relatado (Yamazaki et al., 2011; Borges, 2017). Efeito inibitório frente a células planctônicas de *C. albicans* após exposição de apenas 150 segundos foi também relatada (Borges et al., 2017). Em estudo anterior, Sun et al. (2012) relataram diminuição significativa das concentrações inibitórias mínimas de anfotericina B, fluconazol e caspofungina frente a espécies de *Candida* após exposição a plasma em pressão atmosférica He/O₂ (2%). Em estudo

in vivo, a ação inibitória e anti-inflamatória também foi observada (Borges et al., 2018).

No entanto, até o momento, pouco se conhece o efeito da associação entre o plasma frio em pressão atmosférica com antifúngicos convencionais utilizados no tratamento da candidose bucal.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que nos ensaios de associação, o jato de plasma apresentou efeito antifúngico similar quando aplicado isoladamente ou em associação com nistatina e anfotericina B. Ainda, foi possível concluir que nos tratamentos isolados, o jato de plasma frio apresentou efeito antifúngico mais eficaz do que os tratamentos dos biofilmes utilizando nistatina e anfotericina B no tempo de 5 minutos.

REFERÊNCIAS*

- Abramzon N, Joaquin JC, Bray J, Brelles-Mariño G. Biofilm destruction by RF high-pressure cold plasma jet. *IEEE Trans Plasma Sci.* 2006;34(4 II):1304–9. doi: 10.1109/TPS.2006.877515.
- Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002;78(922):455–9. doi: 10.1136/pmj.78.922.455. PMID: 12185216.
- Alkawareek MY, Algwari QT, Gorman SP, Graham WG, O’Connell D, Gilmore BF. Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;65(2):381–4. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00942.x.
- Alnuaimi AD, O’Brien-Simpson NM, Reynolds EC, Mccullough MJ. Clinical isolates and laboratory reference *Candida* species and strains have varying abilities to form biofilms. *FEMS Yeast Res.* 2013;13(7):689–99. doi: 10.1111/1567-1364.12068.
- Alonso-Coello P, Carrasco-Labra A, Brignardello-Petersen R, Neumann I, Akl EA, Vernooij RW, et al. Systematic reviews suffer from major limitations in reporting absolute effects. *J Clin Epidemiol.* 2015 Nov 8. pii: S0895-4356(15)00505-3. doi: 10.1016/j.jclinepi.2015.11.002.
- Aparecida Delben J, Evelin Zago C, Tyhovyh N, Duarte S, Eduardo Vergani C. 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.
- Bastiani FWM da S, Spadari C de C, de Matos JKR, Salata GC, Lopes LB, Ishida K. Nanocarriers Provide Sustained Antifungal Activity for Amphotericin B and Miltefosine in the Topical Treatment of Murine Vaginal Candidiasis. *Front Microbiol.* 2020;10:1–9. doi: 10.3389/fmicb.2019.02976.
- Borges AC, de Morais Gouvêa Lima G, Mayumi Castaldelli Nishime T, Vidal Lacerda Gontijo A, 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.

* 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 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Brun P, Bernabè G, Marchiori C, Scarpa M, Zuin M, Cavazzana R, et al. Antibacterial efficacy and mechanisms of action of low power atmospheric pressure cold plasma: membrane permeability, biofilm penetration and antimicrobial sensitization. *J Appl Microbiol.* 2018;125(2):398–408. doi: 10.1111/jam.13780.
- Butani D, Yewale C, Misra A. Topical Amphotericin B solid lipid nanoparticles: Design and development. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2016;139:17–24. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.07.032.
- Butts A, Krysan DJ. Antifungal Drug Discovery: Something Old and Something New. *PLoS Pathog.* 2012;8(9):9–11. doi: 10.1371/journal.ppat.1002870.
- Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001;9(7):327–35. doi: 10.1016/S0966-842X(01)02094-7. PMID: 11435107.
- Cannon RD, Holmes AR. Learning the ABC of oral fungal drug resistance. *Mol Oral Microbiol.* 2015;30(6):425–37. doi: 10.1111/omi.12109. PMID: 26042641.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001;183(18):5385–94. doi: 10.1128/JB.183.18.5385. PMID: 11514524.
- Chiodi Borges A, Castaldelli Nishime TM, Kostov KG, de Moraes Gouvêa Lima G, Vidal Lacerda Gontijo A, Nóbrega Martins Marchesotti de Carvalho J, 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.
- Daeschlein G, Scholz S, Ahmed R, Majumdar A, Von Woedtke T, Haase H, et al. Gute Hautverträglichkeit von Plasma: Keine Austrocknung oder Störung der Hautbarriere. *JDDG - J Ger Soc Dermatology.* 2012;10(7):509–16. doi: 10.1111/j.1610-0387.2012.07857. x.
- Dong X, Liu T, Xiong Y. A novel approach to regulate cell membrane permeability for ATP and NADH formation in *Saccharomyces cerevisiae* induced by air cold plasma. *Plasma Sci Technol.* 2017;19(2). doi: 10.1088/2058-6272/19/2/024001.

Doria ACOC, Figueira FR, de Lima JSB, Figueira JAN, Castro AHR, Sismanoglu BN, et al. Inactivation of *Candida albicans* biofilms by atmospheric gliding arc plasma jet: effect of gas chemistry/flow and plasma pulsing. *Plasma Res Express*. 2018;1(1):015001. doi: 10.1088/2516-1067/aae7e1.

Ellepola ANB, Joseph BK, Samaranayake LP, Bandara HMHN, Khan ZU. Impact of brief and sequential exposure to nystatin, amphotericin B, ketoconazole, and fluconazole in modulating adhesion traits of oral *Candida dubliniensis* isolates. *J Investig Clin Dent*. 2016;7(2):149–57. doi: 10.1111/jicd.12132.

Epstein JB, Gorsky M, Caldwell J. Fluconazole mouthrinses for oral candidiasis in postirradiation, transplant, and other patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93(6):671–5. doi: 10.1067/moe.2002.122728.

Ferreira JNAR, Friction J, Rhodus N. Orofacial disorders: Current therapies in orofacial pain and oral medicine. *Orofac Disord Curr Ther Orofac Pain Oral Med*. 2017;1–354. doi: 10.1007/978-3-319-51508-3.

Figueiredo-Carvalho MHG, Ramos LDS, Barbedo LS, De Oliveira JCA, Dos Santos ALS, Almeida-Paes R, et al. Relationship between the Antifungal Susceptibility Profile and the Production of Virulence-Related Hydrolytic Enzymes in Brazilian Clinical Strains of *Candida glabrata*. *Mediators Inflamm*. 2017;2017. doi: 10.1155/2017/8952878.

Finkel JS; Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Feb ;9(2):109–18.

Garcia-Cuesta C, Sarrion-Perez M, Bagan J. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *J Clin Exp Dent*. 2014;6(5):e576–82. doi: 10.4317/jced.51798. PMID: 25674329.

Gøtzsche PC, Johansen HK. Nystatin prophylaxis and treatment in severely immunodepressed patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2017(3). doi: 10.1002/14651858.CD002033.pub2.

Gow NAR, Yadav B. Microbe profile: *Candida albicans*: A shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiol (United Kingdom)*. 2017;163(8):1145–7. doi: 10.1099/mic.0.000499.

Handorf O, Weihe T, Bekeschus S, Graf AC, Schnabel U, Riedel K, et al. Nonthermal plasma jet treatment negatively affects the viability and structure of *Candida albicans* SC5314 biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84(21):1–15. doi: 10.1128/AEM.01163-18.

Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10(1):85–93. doi: 10.1586/eri.11.152. PMID: 22149617.

Joshi SG, Paff M, Friedman G, Fridman G, Fridman A, Brooks AD. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: A biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *Am J Infect Control*. 2010;38(4):293–301.

Kaplan JE, Benson C, Holmes KH, Brooks JT, Pau A, Masur H. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep*. 2009;58(RR-4).

Klämpfl TG, Isbary G, Shimizu T, Li YF, Zimmermann JL, Stolz W, et al. Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(15):5077–82. doi: 10.1128/AEM.00583-12.

Kolb JF, Mohamed AAH, Price RO, Swanson RJ, Bowman A, Chiavarini RL, et al. Cold atmospheric pressure air plasma jet for medical applications. *Appl Phys Lett*. 2008;92(24):24–7. doi: 10.1063/1.2940325.

Kostov KG, Machida M, Prysiaznyi V, Honda RY. Transfer of a cold atmospheric pressure plasma jet through a long flexible plastic tube. *Plasma Sources Sci Technol*. 2015;24(2):025038. doi: 10.1088/0963-0252/24/2/025038.

Lalla R V, Patton LL, Dongari-Bagtzoglou A. Oral candidiasis: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and treatment strategies. *J Calif Dent Assoc*. 2013.

Laroussi M, Leipold F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric

pressure. *Int J Mass Spectrom.* 2004;233(1–3):81–6. doi: 10.1016/j.ijms.2003.11.016.

Laroussi M, Mendis DA, Rosenberg M. Plasma interaction with microbes. *New J Phys.* 2003;5(1):41–41. doi: 10.1088/1367-2630/5/1/341.

Langner I, Kramer A, Matthes R, Rebert F, Kohler C, Koban I, et al. Inhibition of microbial growth by cold atmospheric plasma compared with the antiseptics chlorhexidine digluconate, octenidine dihydrochloride, and polyhexanide. *Plasma Process Polym.* 2019;16(4). doi: 10.1002/ppap.201800162.

Lefebvre JL, Domenge C; Study Group of Mucositis. A comparative study of the efficacy and safety of fluconazole oral suspension and amphotericin B oral suspension in cancer patients with mucositis. *Oral Oncol.* 2002;38:337-42.

Lewis MAO, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. *Br Dent J.* 2017;223(9):675–81. doi: 10.1038/sj.bdj.2017.886.

Liao X, Muhammad AI, Chen S, Hu Y, Ye X, Liu D, et al. Bacterial spore inactivation induced by cold plasma. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018:1–11. doi: 10.1080/10408398.2018.1460797.

Li YF, Shimizu T, Zimmermann JL, Morfill GE. Cold atmospheric plasma for surface disinfection. *Plasma Process Polym.* 2012;9(6):585–9. doi: 10.1002/ppap.201100090.

López-Castillo C, Rodríguez-Fernández C, Córdoba M, Torrado J. Permeability Characteristics of a New Antifungal Topical Amphotericin B Formulation with γ -Cyclodextrins. *Molecules.* 2018;23(12):3349. doi: 10.3390/molecules23123349.

Lyu X, Zhao C, Yan Z, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:1161–71. doi: 10.2147/DDDT.S100795. PMID: 27042008.

Maisch T, Shimizu T, Isbary G, Heinlin J, Karrer S, Klämpfl TG, et al. Contact-free inactivation of *Candida albicans* biofilms by cold atmospheric air plasma. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(12):4242–7. doi: 10.1128/AEM.07235-11.

- Mai-Prochnow A, Murphy AB, McLean KM, Kong MG, Ostrikov K. Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(6):508–17. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.01.025.
- Mathé L, Van Dijck P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr Genet*. 2013;59(4):251–64. doi: 10.1007/s00294-013-0400-3.
- McCombs GB, Darby ML. New discoveries and directions for medical, dental and dental hygiene research: low temperature atmospheric pressure plasma. *Int J Dent Hyg*. 2010;8(1):10–5. doi: 10.1111/j.1601-5037.2009.00386.x. PMID: 20096076.
- Mitchell, K. F., Zarnowski, R., Andes, D. R. (2016). The Extracellular Matrix of Fungal Biofilms. *Adv Exp Med Biol*.2016; 6(1):21–35. doi:10.1007/5584_2016_6.
- Mohr J., Johnson M., Cooper T., Lewis J., Ostrosky-Zeichner L. Current Options in Antifungal Pharmacotherapy. *Pharmacotherapy*. 2008;28(5):614–45. doi: 10.1592/phco.28.5.614. PMID: 18447660.
- Monteiro Ic, Ribeiro Ila, Batista Rfbd, Maciel Pp, Valença Amg, Dulgheroff Acb, et al. *Candida* on oral cavity of pediatric individuals with ALL and its susceptibility to nystatin and amphotericin B. *RGO - Rev Gaúcha Odontol*. 2019;67:1–9. doi: 10.1590/1981-86372019000183558.
- Mount HO, Revie NM, Todd RT, Anstett K, Collins C, Costanzo M, et al. Global analysis of genetic circuitry and adaptive mechanisms enabling resistance to the azole antifungal drugs. *PLOS Genet*. 2018;14(4):e1007319. doi: 10.1371/journal.pgen.1007319.
- Niemira BA. Cold plasma decontamination of foods. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2012;3(1):125–42. doi: 10.1146/annurev-food-022811-101132. PMID: 22149075.
- Oliveira SMM, Silva NS, Sene A, Gandra RF, Junges DSB, Ramos MAR, et al. Comparative Study of *Candida albicans* Inactivation by Nonthermal Plasma on Stainless Steel with and without Diamond-like Carbon Film. *ACS Omega*. 2019;4(4):6891–902. doi: 10.1021/acsomega.8b03640.
- 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):e1–50. doi: 10.1093/cid/civ933. PMID: 26679628.

Patil S, Rao RS, Majumdar B, Anil S. Clinical Appearance of Oral *Candida* Infection and Therapeutic Strategies. *Front Microbiol*. 2015;6(DEC):1391. doi: 10.3389/fmicb.2015.01391. PMID: 26733948.

Pawłat, J., Kwiatkowski, M., Terebun, P., Chudzik, B., Gagoś, M. "Candida albicans inactivation with DBD He/O₂ plasma jet" International Conference on Electromagnetic Devices and Processes in Environment Protection with Seminar Applications of Superconductors (ELMECO & AoS), Lublin, 2017, pp. 1-4, doi: 10.1109/ELMECO.2017.8267745.

Perez AP, Altube MJ, Schilrreff P, Apezteguia G, Celes FS, Zacchino S, et al. Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: Formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2016;139:190–8. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.12.003.

Perfect JR. The antifungal pipeline: A reality check. *Nat Rev Drug Discov*. 2017. doi: 10.1038/nrd.2017.46. PMID: 28496146.

Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(12):e383–92. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30316-X.

Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol*. 2007;45(4):321–46. doi: 10.1080/13693780701218689.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36(1):1–53. doi: 10.3109/10408410903241444. PMID: 20088682.

Qasim M, Baipaywad P, Udomluck N, Na D, Park H. Enhanced therapeutic efficacy of lipophilic amphotericin B against *Candida albicans* with amphiphilic poly(N-isopropylacrylamide) nanogels. *Macromol Res*. 2014;22(10):1125–31. doi: 10.1007/s13233-014-2162-2.

Quindós G, Gil-Alonso S, Marcos-Arias C, Sevillano E, Mateo E, Jauregizar N, et al. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019;24(2):e172–80. doi: 10.4317/medoral.22978.

Rahimi-Verki N, Shapoorzadeh A, Razzaghi-Abyaneh M, Atyabi SM, Shams-Ghahfarokhi M, Jahanshiri Z, et al. Cold atmospheric plasma inhibits the growth of *Candida albicans* by affecting ergosterol biosynthesis and suppresses the fungal virulence factors in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016;13(2016):66–72. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.12.007. PMID: 26739496.

Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic Therapy. *Dermatol Clin*. 2014;32(3):415–25. doi: 10.1016/j.det.2014.03.009. PMID: 24891062.

Rodrigues ME, Silva S, Azeredo J, Henriques M. Novel strategies to fight *Candida* species infection. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42(4):594–606. doi: 10.3109/1040841X.2014.974500.

Salazar SB, Simões RS, Pedro NA, Pinheiro MJ, Carvalho MFNN, Mira NP. An overview on conventional and non-conventional therapeutic approaches for the treatment of candidiasis and underlying resistance mechanisms in clinical strains. *J Fungi*. 2020;6(1):1–26. doi: 10.3390/jof6010023.

Sarangapani C, Misra NN, Milosavljevic V, Bourke P, O'Regan F, Cullen PJ. Pesticide degradation in water using atmospheric air cold plasma. *J Water Process Eng*. 2016;9:225–32. doi: 10.1016/j.jwpe.2016.01.003. PMID: 24217399.

Search K. Plasma Surface Treatment In Composites Manufacturing. *J Ind Technol*. 1999;15(1):1–7.

Seneviratne CJ, Rajan S, Wong SSW, Tsang DNC, Lai CKC, Samaranyake LP, et al. Antifungal Susceptibility in Serum and Virulence Determinants of *Candida* Bloodstream Isolates from Hong Kong. *Front Microbiol*. 2016 Feb; 7:216. doi: 10.3389/fmicb.2016.00216. PubMed PMCID: 22149075.

Serrano DR, Fernandez-Garcia R, Mele M, Healy AM, Lalatsa A. Designing fast-dissolving orodispersible films of amphotericin b for oropharyngeal candidiasis. *Pharmaceutics*. 2019;11(8). doi: 10.3390/pharmaceutics11080369. PMID: 31374879.

Sherry L, Ramage G, Kean R, Borman A, Johnson EM, Richardson MD. Biofilm-Forming Capability of Highly Virulent. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(2):328–31.

Skupien JA, Valentini F, Boscato N, Pereira-Cenci T. Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: A systematic review. *J Prosthet Dent*. 2013;110(5):356–62. doi: 10.1016/j.prosdent.2013.07.003.

Sosa L, Clares B, Alvarado HL, Bozal N, Domenech O, Calpena AC. Amphotericin B releasing topical nanoemulsion for the treatment of candidiasis and aspergillosis. *Nanomedicine*. 2017;13(7):2303–12. doi: 10.1016/j.nano.2017.06.021.

Sreedhar, Annaji V., Haritha B., Radhika K., Sreedevi W., Amit B., Uthappa Hari., et al. Comparative Evaluation of the Efficacy of Garlic and Propolis Extracts Against *Candida albicans* With Amphotericin-B As Control - an in-Vitro Study. *Int J Sci Res*. 2019(10):1–4. doi: 10.36106/ijsr/2605076.

Sun Y, Yu S, Sun P, Wu H, Zhu W, Liu W, et al. Inactivation of *Candida* biofilms by non-thermal plasma and its enhancement for fungistatic effect of antifungal drugs. *PLoS One*. 2012;7(7): e40629. doi: 10.1371/journal.pone.0040629. PMID: 22808213.

Szili EJ, Hong SH, Oh JS, Gaur N, Short RD. Tracking the Penetration of Plasma Reactive Species in Tissue Models. *Trends Biotechnol*. 2018;36(6):594–602. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.07.012.

Taff H.T., Mitchell K.F., Edward J.A., Andes D.R.. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol*. 2013;8(10):1325–37. doi: 10.2217/fmb.13.101.

Taillander J. A comparison of fluconazole oral suspension and amphotericin B oral suspension in older patients with oropharyngeal candidosis. *Age Ageing*. 2000;29(2):117–23. doi: 10.1093/ageing/29.2.117.

Theinkom F, Singer L, Cieplik F, Cantzler S, Weilemann H, Cantzler M, et al. Antibacterial efficacy of cold atmospheric plasma against *Enterococcus faecalis* planktonic cultures and biofilms in vitro. *PLoS One*. 2019;14(11):1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0223925.

Thomas S, Izard J, Walsh E, Batich K, Chongsathidkiet P, Clarke G, et al. Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer Res*. 2017;77(8):1783–812. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2929.

Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP, Torrado-Santiago S. Amphotericin B Formulations and Drug Targeting. *J Pharm Sci* . 2008;97(7):2405. doi:10.1002/jps.21179.

Traba C, Liang JF. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms to reactive discharge gases. *Biofouling*. 2011;27(7):763–72. doi: 10.1080/08927014.2011.602188.

Vediyappan G, Rossignol T, D'Enfert C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: Transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(5):2096–111. doi: 10.1128/AAC.01638-09.

von Woedtke T, Reuter S, Masur K, Weltmann K-D. Plasmas for medicine. *Phys Rep*. 2013;530(4):291–320. doi: 10.1016/j.physrep.2013.05.005.

Wang L, Liu D, Zhao X, Wu L, Zhou Y, Chen Q, et al. Persistent and refractory thrush with unknown cause. *J Craniofac Surg*. 2015;26(2):e106–8. doi: 10.1097/SCS.0000000000001326.

Wiegand C, Fink S, Hipler UC, Beier O, Horn K, Pfuch A, et al. Cold atmospheric pressure plasmas exhibit antimicrobial properties against critical bacteria and yeast species. *J Wound Care*. 2017;26(8):462–8. doi: 10.12968/jowc.2017.26.8.462.

Williams DW, Jordan RPC, Wei X-Q, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *J Oral Microbiol*. 2013;5(1):22434. doi: 10.3402/jom.v5i0.

Wilson D. *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2019;27(2):188–9. doi: 10.1016/j.tim.2018.10.010.

Zhang P, Yang X, He Y, Chen Z, Liu B, Ernesto CS, et al. Preparation, characterization and toxicity evaluation of amphotericin B loaded MPEG-PCL micelles and its application for buccal tablets. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101(19):7357–70. doi: 10.1007/s00253-017-8463-6.

Zhou L, Zhang P, Chen Z, Cai S, Jing T, Fan H, et al. Preparation, characterization, and evaluation of amphotericin B-loaded MPEG-PCL-g-PEI micelles for local treatment of oral *Candida albicans*. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:4269–83. doi: 10.2147/IJN.S124264.