



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 nucléicos (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.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

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.

2.1.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente projeto foram:

- a) determinar as concentrações inibitórias dos antifúngicos poliênicos nistatina e anfotericina B e do plasma frio em pressão atmosférica sobre biofilmes de *C. albicans*;
- b) avaliar o efeito da combinação dos tratamentos em condições/concentrações sub-inibitórias, incluindo os tratamentos isolados para fins de comparação;
- c) avaliar diferentes protocolos de aplicação dos tratamentos, visando obter a condição experimental mais eficaz para o controle do biofilme fúngico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

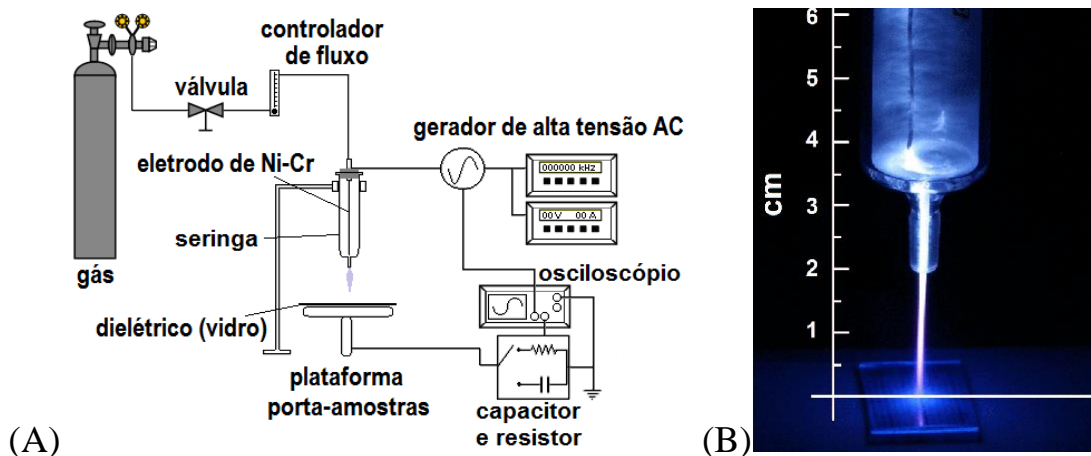
3.1 Cepas e condições de crescimento

Neste estudo, foi utilizada a cepa padrão de *C. albicans* SC 5314 (cepa referência wild-type), incluindo uma cepa clínica previamente isolada de um paciente com candidose bucal (P 29). Essas cepas permaneceram armazenadas em caldo Sabouraud com 20% de glicerol a -80°C. Os inóculos utilizados nos testes, foram obtidos a partir de uma cultura desses micro-organismos em ágar Sabouraud dextrose por 24 horas a 37°C, em aerobiose. Devido à utilização da cepa clínica, o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos – CONEP (CAAE 83576218.7.0000.0077) (ANEXO A).

3.2 Jato de plasma frio sob pressão atmosférica

O equipamento gerador de plasma utilizado neste estudo, foi previamente desenvolvido e validado (Kostov et al., 2014). O jato de plasma frio em pressão atmosférica foi gerado dentro de uma seringa de vidro (volume de 10 ml) contendo um fio fino (0,45 mm) de Ni-Cr, conectado a um gerador de alta tensão alternada (Minipuls4 da GBS, Elektronik, Dresden, Germany) com amplitude entre 12 kV e frequência de 31 kHz. O equipamento utilizou o gás Hélio (He) com vazão entre 2 L/min controlada por um rotâmetro (Figura 1). A potência do jato foi de ≈ 0.6 W e a temperatura manteve-se sempre abaixo de 40°C.

Figura 1- Esquema do aparato para geração do jato de plasma frio sob pressão atmosférica (A) e imagem do jato gerado (B)



Fonte: Borges et al. (2017).

3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos fármacos nistatina e anfotericina B

A determinação da CIM foi feita pela técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2008). As soluções estoques dos fármacos nistatina e anfotericina B, foram diluídas 50x em meio de cultura RPMI 1640 (pH 7,0; tamponado com MOPS), assim, obtendo-se a concentração final de 32 $\mu\text{g/mL}$ para ambos os fármacos. Em seguida, adicionou-se 100 μL destas suspensões na primeira coluna da placa de 96 poços.

Para as diluições, 100 μL das substâncias na concentração inicial foram pipetadas nas colunas subsequentes, contendo 100 μL de RPMI. Em seguida, 100 μL da suspensão celular padronizada ($\sim 10^3$ células/ml), foi adicionada nos poços. O controle de crescimento foi composto por 100 μL do meio de cultura e 100 μL

da suspensão celular e para o controle de esterilidade do meio, este era composto por 200 µl de RPMI.

A determinação da CIM, foi feita após 24 horas de incubação a 37°C , por meio de leitura visual da turvação em comparação ao crescimento do grupo controle de acordo com a CLSI, 2008. Para a nistatina, a CIM foi a concentração em que se observou 50% de inibição em relação ao controle e para anfotericina a concentração que houve 100% de inibição em comparação ao controle. Os ensaios foram realizados em triplicata em 3 ocasiões diferentes.

3.4 Formação dos biofilmes e determinação da concentração/condição anti-biofilme efetiva

Inicialmente, determinou-se as concentrações anti-biofilme efetivas de nistatina e anfotericina B frente a biofilmes de *C. albicans* com 24 e 48 horas. Para formação dos biofilmes, 200 µl de caldo RPMI (acrescido de 2 % de glicose) e 10 µl de inóculo contendo 10^6 células ml^{-1} foram adicionados a placas de microtitulação de 96 poços. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C por 90 minutos (fase de pré adesão) em um agitador rotatório orbital a 80 rpm. Após este período, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com solução fisiológica estéril para retirada das células não aderidas ao fundo dos poços. Posteriormente, meio de cultura novo foi adicionado e os biofilmes foram cultivados em estufa a 37°C durante 24 e 48 horas.

Após esta etapa, o meio de cultura foi retirado, os biofilmes foram lavados com solução fisiológica estéril e tratados com nistatina e anfotericina B nas concentrações de 10 vezes CIM por 5 minutos. Para confirmação das condições anti-biofilme efetivas do plasma frio em pressão atmosférica, o jato de plasma foi

aplicado nos biofilmes por 5 minutos, a uma distância de 1,5 cm entre a saída do jato e a superfície do poço da placa. Este tempo e distância foi padronizado anteriormente por Borges et al. (2016). Após a diluição em série, inoculação em ágar Sabouraud dextrose e incubação (37°C, 24 horas), a viabilidade dos biofilmes foi determinada através de contagem de UFC/mL e os valores foram comparados com os biofilmes não expostos aos tratamentos mencionados anteriormente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três ocasiões diferentes (n=9).

3.5 Associação das condições sub-inibitórias e determinação da concentração/condição anti-biofilme efetiva

Para os ensaios de associação, adotou-se 50% do tempo de exposição em relação ao tempo com atividade anti-biofilme efetiva, observado por Borges et al. (2016). Assim, estabeleceu-se o tempo de 2,5 minutos para exposição do biofilme ao jato de plasma, mantendo-se a mesma distância de 1,5 cm entre a saída do jato e a superfície do poço da placa.

No que se refere ao tratamento com os antifúngicos nistatina e anfotericina B, reduções de 75% de 10 x CIM (60 µg/mL para nistatina e 3,75 µg/mL para anfotericina B), 50% de 10 x CIM (40 µg/mL para nistatina e 2,5 µg/mL para anfotericina B) foram adotadas.

As associações foram feitas conforme os seguintes grupos experimentais: a) Tratamento do biofilme com antifúngico poliênico seguido por exposição ao plasma; b) Tratamento do biofilme com plasma seguido por exposição ao antifúngico poliênico. Também foram feitos tratamentos isolados com aplicação do jato de plasma e os antifúngicos nas mesmas condições mencionadas

anteriormente, para fins de comparação. Os testes de associação foram realizados com biofilmes de 24 horas até o momento.

3.6 Análise dos dados

Após a análise de distribuição dos dados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, os dados obtidos nas contagens de colônias, expressos em valores de média \pm desvio padrão, foram comparados estatisticamente utilizando software GraphPad Prism[®] 7.0 (GraphPad Software Inc.), pelo teste One-way ANOVA e post hoc teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos fármacos nistatina e anfotericina B

Os valores de CIM encontrados para os fármacos nistatina e anfotericina B, relacionado às cepas utilizadas no presente estudo foram de 8 µg/mL para nistatina e 0,5 µg/mL para anfotericina B respectivamente. As concentrações de 10 vezes a CIM para ambos os fármacos, foram adotadas para tratamento dos biofilmes na determinação das condições anti-biofilme.

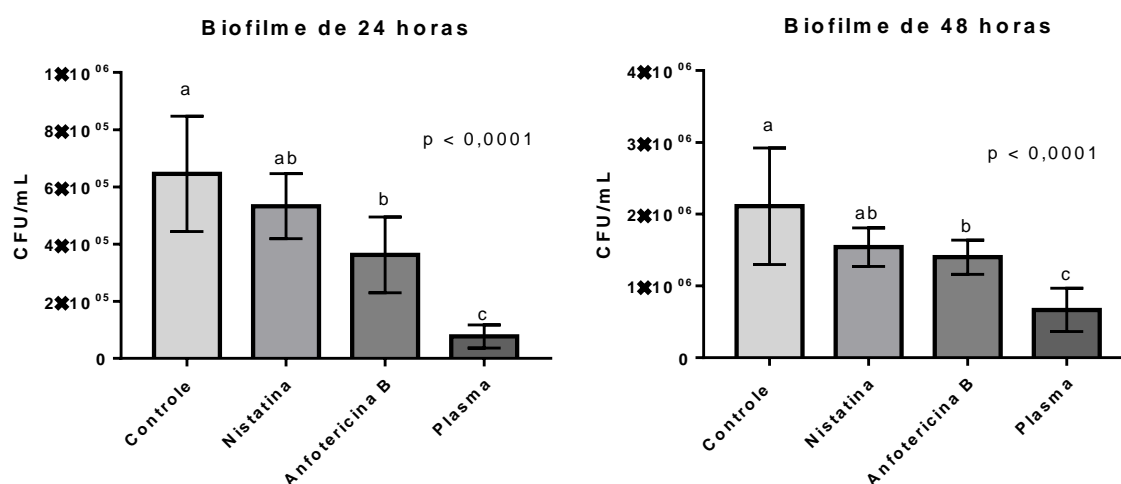
4.2 Determinação das condições anti-biofilme dos antifúngicos convencionais e do jato de plasma

Redução significativa das contagens de UFC/mL foi observada quando biofilmes de 24 horas da cepa de *C. albicans* SC 5314 foram expostos ao jato de plasma por 5 minutos em relação ao controle não tratado ($p < 0,0001$) e aos tratamentos com nistatina ($p < 0,0001$) e anfotericina B ($p = 0,0005$), na concentração de 10 vezes a CIM por 5 minutos (Figura 2). Observou-se também uma redução estaticamente significativa do tratamento com anfotericina B, quando comparado ao controle ($p = 0,0005$).

Para os biofilmes de 48 horas, os resultados apresentaram significativa redução de UFC/mL nos biofilmes expostos ao jato de plasma por 5 minutos, quando comparado ao controle não tratado e aos tratamentos com nistatina e

anfotericina B ($p < 0,0001$, $p = 0,0021$ e $p = 0,0115$ respectivamente). Redução estatisticamente significativa de UFC/mL também foi observada para o tratamento com anfotericina B, em relação ao controle não tratado ($p = 0,0149$).

Figura 2- Viabilidade dos biofilmes de 24 e 48 horas de *C. albicans* SC 5314, expressa em valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL, média e desvio padrão) expostos ao jato de plasma por 5 minutos; nistatina 5 minutos; anfotericina B por 5 minutos e grupo controle negativo não tratado



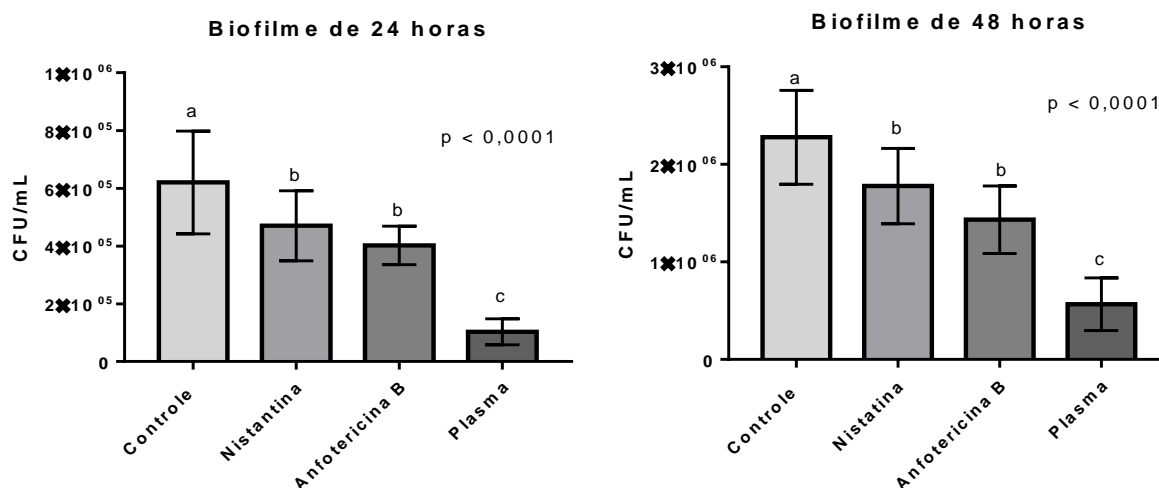
Legenda: letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante (One-way ANOVA/post hoc Tukey).

Fonte: elaborado pelo autor.

Os resultados referentes aos biofilmes da cepa P29 (Figura 3), mostram que os tratamentos com nistatina e anfotericina B apresentaram redução significativa em relação ao controle ($p = 0,0433$ e $p = 0,0018$ respectivamente), no entanto, a aplicação do jato de plasma nos biofilmes de 24 horas por 5 minutos, foi mais efetivo na redução na contagem de UFC/mL, em comparação ao controle sem tratamento ($p < 0,0001$), nistatina ($p < 0,0001$) e anfotericina B ($p < 0,0001$).

Já em relação ao biofilme de 48 horas, os tratamentos com nistatina e anfotericina B apresentaram redução significativa de sua viabilidade em relação ao controle ($p = 0,0407$ e $p = 0,0002$ respectivamente). Redução na viabilidade dos biofilmes também foi observada após exposição ao jato de plasma por 5 minutos, apresentando significativa redução de UFC/mL, quando comparado ao controle sem tratamento ($p < 0,0001$), nistatina ($p < 0,0001$) e ao tratamento com anfotericina B ($p = 0,0002$).

Figura 3- Viabilidade dos biofilmes de 24 e 48 horas da cepa clínica P29, expressa em valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL, média e desvio padrão) expostos ao jato de plasma por 5 minutos; nistatina 5 minutos; anfotericina B por 5 minutos e grupo controle negativo não tratado



Legenda: letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante (One-way ANOVA/post hoc Tukey).

Fonte: elaborado pelo autor.

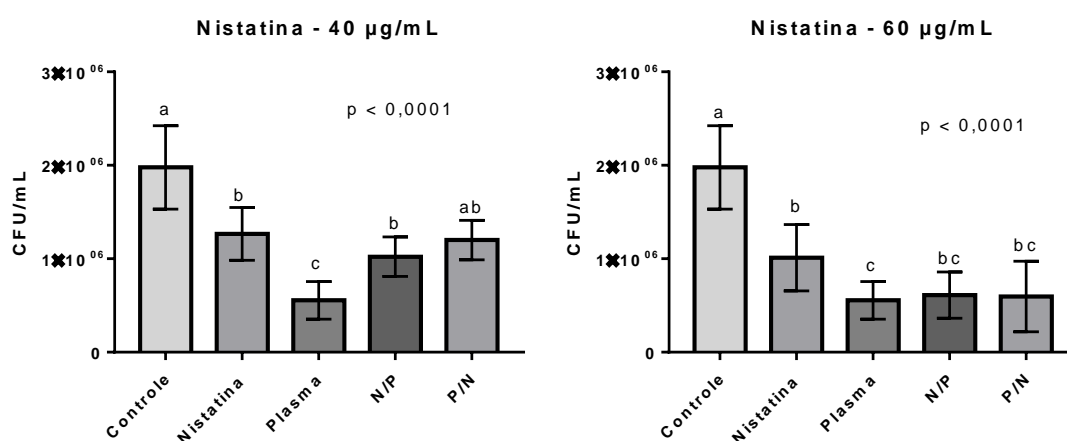
4.3 Associação das condições sub-inibitórias e determinação da concentração/condição anti-biofilme efetiva

4.3.1. Nistatina e plasma

Observa-se na figura 4, que houve redução significativa na viabilidade dos biofilmes de 24 horas de *C. albicans* SC 5314 quando tratados com nistatina (40 µg/ml) em relação ao grupo controle não tratado ($p < 0,0001$), observando-se também uma redução significativa nas associações nistatina/plasma ($p < 0,0001$) e plasma/nistatina ($p < 0,0001$) em comparação ao controle. Observou-se também significativa redução após exposição ao plasma por 2,5 minutos, quando comparado ao controle ($p < 0,0001$), ao tratamento com nistatina ($p < 0,0001$) e as associações nistatina/plasma ($p = 0,0107$) e plasma/nistatina ($p = 0,0002$).

Para os biofilmes tratados com nistatina 60 µg/mL, observou-se diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$) e também com relação às associações nistatina/plasma ($p < 0,0001$) e plasma/nistatina ($p < 0,0001$) em relação ao controle. Redução significativa com relação a aplicação de plasma por 2,5 minutos foi observada, quando comparada ao controle ($p < 0,0001$) e ao tratamento com nistatina ($p = 0,0492$).

Figura 4- Viabilidade dos biofilmes de 24 horas de *C. albicans* SC 5314, expressa em valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL, média e desvio padrão), tratados com plasma (2,5 min), nistatina (40 µg/mL e 60 µg/mL), plasma seguido de nistatina (plasma/nistatina), nistatina seguida de plasma (nistatina/plasma) e grupo controle negativo não tratado



Legenda: letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (One-way ANOVA/post hoc Tukey).

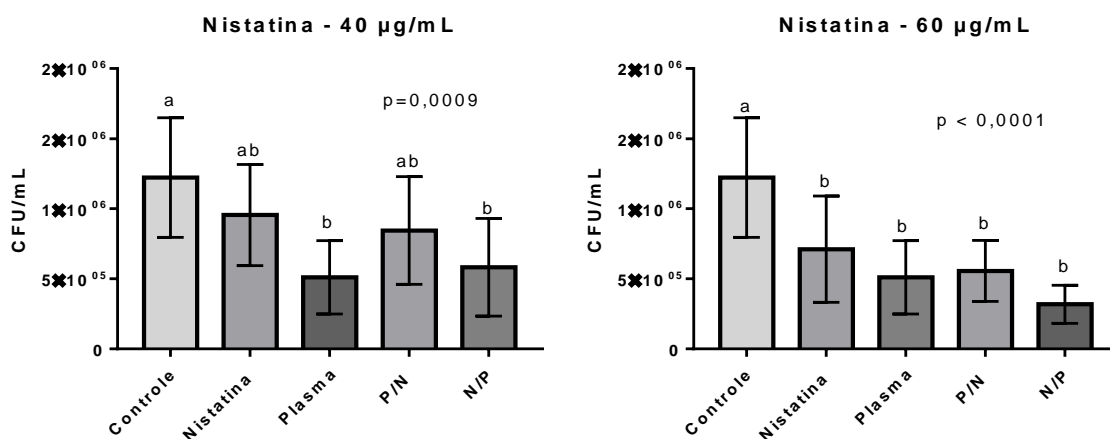
Fonte: elaborado pelo autor.

Não houve redução significativa da viabilidade dos biofilmes de 24 horas formados pela cepa clínica (figura 5) quando expostos à nistatina (40 µg/mL). No entanto, observou-se redução significativa nos biofilmes expostos ao plasma por 2,5 minutos ($p=0,0014$) e na associação nistatina (40 µg/mL) seguida pelo plasma ($p=0,0046$). Os biofilmes tratados com a associação plasma seguido de nistatina (40 µg/mL) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle não tratado.

Redução significativa foi observada biofilmes formados pela cepa clínica (figura 5) quando expostos à nistatina (60 µg/mL) ($p=0,0079$), ao tratamento com plasma por 2,5 minutos ($p=0,0001$), incluindo as associações nistatina (60

$\mu\text{g/mL}$) seguida pelo plasma ($p < 0,0001$) e plasma seguido de nistatina ($60 \mu\text{g/mL}$) ($p=0,0003$), todos em relação ao controle não tratado.

Figura 5- Viabilidade dos biofilmes de 24 horas da cepa clínica P29, expressa em valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL, média e desvio padrão), tratados com plasma (2,5 min), nistatina ($40 \mu\text{g/mL}$ e $60 \mu\text{g/mL}$), plasma seguido de nistatina (plasma/nistatina), nistatina seguida de plasma (nistatina/plasma) e grupo controle negativo não tratado



Legenda: letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante (One-way ANOVA/post hoc Tukey).

Fonte: elaborado pelo autor.

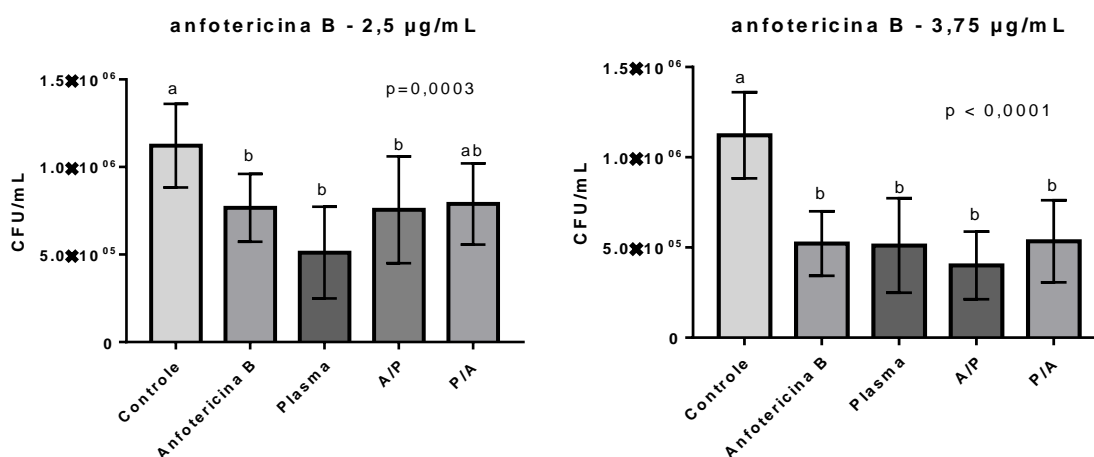
4.3.2. Anfotericina B e plasma

No que se refere aos biofilmes tratados com anfotericina, observa-se na figura 6, que os biofilmes de 24 horas de *C. albicans* SC 5314, quando comparados ao controle (sem tratamento), apresentaram redução significativa da viabilidade quando foram expostos à anfotericina B ($2,5 \mu\text{g/mL}$) ($p=0,0327$) e a

associação anfotericina B (2,5 $\mu\text{g/mL}$) seguida pelo plasma ($p= 0,0258$) . No entanto, quando os biofilmes foram expostos ao plasma por 2,5 minutos, houve redução significativa da viabilidade ($p < 0,0001$). Não houve redução significativa na associação plasma seguido pela anfotericina (2,5 $\mu\text{g/mL}$) em comparação ao controle.

Para os biofilmes tratados com anfotericina B na concentração de 3,75 $\mu\text{g/mL}$, foi observada diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). Observou-se também redução significativa na viabilidade do biofilme após exposição ao plasma por 2,5 minutos ($p < 0,0001$) e nas associações plasma/nistatina e nistatina/plasma, quando comparado ao controle sem tratamento ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$ respectivamente).

Figura 6- Viabilidade dos biofilmes de 24 horas da cepa de *C. albicans* SC 5314, expressa em valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL, média e desvio padrão), tratados com plasma (2,5 min), anfotericina B (3,75 µg/ml e 2,5 µg/mL), plasma seguido de anfotericina B (P/A), anfotericina B seguida de plasma (A/P) e grupo controle negativo não tratado

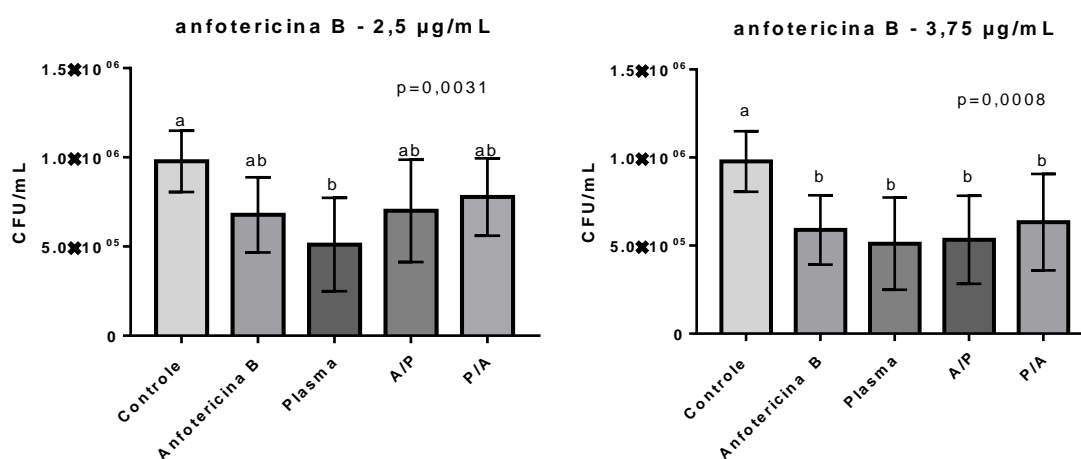


Legenda: letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante (One-way ANOVA/post hoc Tukey).

Fonte: elaborado pelo autor.

Não houve redução significativa da viabilidade dos biofilmes de 24 horas da cepa clínica (figura 7) quando expostos à anfotericina B (2.5 µg/mL) e as associações anfotericina B (2,5 µg/mL) seguida pelo plasma e plasma seguindo de anfotericina B (2.5 µg/mL), apenas quando expostos ao plasma 2,5 minutos (p= 0,0011). Redução significativa foi observada em relação ao controle, quando os biofilmes foram tratados com a concentração de 3,75 µg/mL de anfotericina B (p= 0,0091), aplicação de plasma por 2,5 minutos (p= 0,0012) e os tratamentos associados plasma seguido de anfotericina B (3,75 µg/mL) (p= 0,0262) e anfotericina B (3,75 µg/mL) seguida de plasma (p=0,0022).

Figura 7- Viabilidade dos biofilmes de 24 horas da cepa clínica P29, expressa em valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL, média e desvio padrão), tratados com plasma (2,5 min), anfotericina B (3,75 $\mu\text{g/mL}$ e 2,5 $\mu\text{g/mL}$), plasma seguido de anfotericina B (P/A), anfotericina B seguida de plasma (A/P) e grupo controle negativo não tratado



Legenda: letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante (One-way ANOVA/post hoc Tukey).

Fonte: elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Estudos anteriores demonstram a eficácia da aplicação do jato de plasma frio para o controle biofilmes de *Candida* (Borges et al., 2016; Pawlat et al., 2017; Doria et al., 2018; Handorf et al., 2018). No entanto, não existem relatos na literatura que demonstrem o efeito da associação entre o plasma frio em pressão atmosférica e antifúngicos convencionais utilizados no tratamento da candidose bucal. Assim, neste estudo, a nistatina foi selecionada para associação com o plasma por ser o padrão ouro no tratamento de infecções fúngicas bucais. Adicionalmente, também avaliamos a associação com a anfotericina B, fármaco que é utilizado em alguns países para o tratamento da candidose bucal refratária ao tratamento convencional (Quindós et al., 2019) e tem sido estudado como alternativa futura para o tratamento da candidose bucal, associado à nanotecnologia de drug delivery (Butani et al., 2016; Sosa et al., 2017; Castilho et al., 2018; Bastiani et al., 2019)

Na prática clínica, o uso tópico de nistatina para o tratamento de lesões fúngicas superficiais tem sido recomendada, principalmente em casos de candidoses bucais (Skupien et al., 2013). No entanto, algumas limitações são relatadas como a resistência ao tratamento em pacientes com diabetes do tipo 2. No estudo de Saavedra et al. 2018, foi observado que as características salivares dos pacientes, como o pH, podem influenciar na efetividade do tratamento. A anfotericina possui alta atividade contra *Candida* spp. com baixo risco de resistência, mas seus efeitos adversos são limitantes a seu uso clínico, principalmente com relação a sua baixa solubilidade em água (0,001 mg/mL) (Qasim et al., 2014; Serrano et al., 2019). Essas limitações dos tratamentos disponíveis apontam para a necessidade do desenvolvimento de novas terapias para uso na prática clínica.

A resistência de cepas clínicas de *C. albicans* às drogas antifúngicas já foi relatada em alguns estudos (Pérez et al., 2016; Figueiredo et al., 2017; Salazar et al., 2020). Um estudo feito por Alnuaimi et al., 2013, demonstrou que cepas de referência laboratoriais de *Candida* e isolados clínicos formam biofilmes em taxas diferentes, dessa forma, a seleção de cepas de referência laboratoriais em estudos de biofilme pode ser crítica para a avaliação da virulência. Por esta razão, optou-se pelo uso de uma cepa clínica e uma cepa de referência.

No presente estudo, os valores de CIM encontrados foram de 0,5 µg/ml para anfotericina B e 8 µg/ml para nistatina respectivamente. Estudos utilizando cepas do gênero *Candida* demonstram que em testes de suscetibilidade *in vitro*, a concentração inibitória mínima (CIM) pode variar de 1 a 8 µg/mL para nistatina, podendo apresentar resistência em isolados clínicos (Gøtzsche, Johansen, 2014; Quindós et al., 2019; Monteiro et al., 2019). Para anfotericina B as CIMs podem variar entre 0.5–1.0 µg/mL (Ellepola et al., 2014; Sherry et al., 2017; Sreedhar et al., 2019). Assim, os resultados obtidos corroboram os encontrados na literatura.

Ensaio para a determinação da CIM utiliza micro-organismos em suspensão. Considerando que os biofilmes são mais resistentes às terapias quando comparadas às células planctônicas (Mathé, Van Dijck, 2013), no presente estudo, estas concentrações foram aumentadas em 10x CIM, para o tratamento dos biofilmes. Assim, concentrações iniciais de 80 µg/ml para nistatina e de 5 µg/ml para anfotericina B foram utilizadas para determinação das condições anti-biofilme.

No que se refere ao tempo de exposição do jato de plasma, já é demonstrado na literatura em estudos *in vitro*, que a aplicação do jato de plasma por 5 minutos, mostra-se eficiente no controle de biofilmes fúngicos (Borges et al., 2016; Handorf et al., 2018;). Por esta razão, neste estudo utilizou-se do mesmo tempo de exposição do jato de plasma, quando determinou-se as condições anti-biofilme, utilizando-se também o mesmo tempo de exposição para os antifúngicos

nistatina e anfotericina, a fim de se verificar a eficiência de inativação dos tratamentos no mesmo tempo de exposição e assim padronizar as condições sub-inibitórias utilizadas nos ensaios de associação.

Neste estudo, foi possível observar que nos tratamentos isolados no tempo de 5 minutos, para determinação das condições sub-inibitórias, a aplicação do jato de plasma nos biofilmes de 24 e 48 horas de ambas as cepas, foi mais efetivo em comparação aos tratamentos com os fármacos nistatina e anfotericina B. A partir dos resultados obtidos nos tratamentos de 5 minutos, considerou-se o tempo 2,5 minutos como sub-inibitório, sendo utilizado nos ensaios de associação.

A resistência aos antifúngicos é um processo multifatorial (Rkein, 2010). Usualmente, um medicamento antifúngico age usando o princípio de bloqueio e chave. Isso significa que um agente antifúngico específico deve se encaixar de uma certa maneira dentro ou fora de uma célula fúngica para induzir um efeito antifúngico (Maisch et al., 2012). Antifúngicos poliênicos, como a nistatina e a anfotericina B, têm como principal alvo de ação a membrana celular fúngica, por serem compostos por moléculas anfifílicas que permitem a ligação com esteróis, principalmente ergosterol, presente na membrana celular dos fungos. Essa ligação altera a permeabilidade da membrana, com a liberação de íons monovalentes (K^+ , Na^+ , H^+ e Cl^-) e pequenas moléculas orgânicas, levando à morte celular (Lewis, Wilians, 2017).

Por outro lado, o plasma atmosférico frio resulta na geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como O e N atômicos e peróxido de hidrogênio interagindo com o vapor de água. Todas essas espécies são capazes de induzir danos oxidativos ao biofilme, durante o tratamento com plasma e nesse caso, nenhuma interação específica é necessária para induzir o efeito antifúngico, como ocorre no mecanismo de ação das drogas antifúngicas (Wiegand et al., 2017; Oliveira et al., 2019). A ação direta do jato de plasma frio na parede e na membrana celular de *C. albicans* também já foi relatada (Verki et al., 2016). Em

contraste com a terapia convencional, a literatura sugere que um grande benefício com uso do plasma frio, é que a resistência antimicrobiana é menos provável de ocorrer devido aos seus múltiplos modos de ação e diversidade de agentes ativos (Alkawareek et al., 2012; Mai-Prochnow et al., 2014; Delben et al., 2016).

Outro fator importante relacionado à resistência antifúngica, é a presença da matriz extracelular. A resistência antifúngica aumenta à medida em que o biofilme se desenvolve, com a matriz extracelular emergindo como um mecanismo relevante durante o estágio maduro do crescimento do biofilme. (Chandra et al., 2001; Taff et al., 2013). Um estudo feito por VEDIYAPPAN et al. (2010), demonstrou a importância da matriz extracelular para a proteção dos fungos contra anfotericina. O efeito da matriz do biofilme não foi abordado nesse estudo e seria um ponto interessante a ser avaliado em estudos futuros.

Embora a terapia convencional de agentes fortemente carregados ou quimicamente reativos falhe em alcançar o biofilme devido à matriz polimérica extracelular carregada negativamente, que atua como uma barreira de troca iônica, algumas moléculas pequenas presentes nas espécies reativas do jato de plasma são capazes de penetrar no biofilme por canais com diâmetros variados (Traba, Liang, 2016). Com base nessas informações, se forem desenvolvidos métodos de inibição da matriz, eles podem ser mais úteis em combinação com antifúngicos existentes que, por si só, são ineficazes contra biofilmes (Mitchell et al., 2016).

A associação dos fármacos nistatina e anfotericina B com 75% de redução (10x CIM), a aplicação do jato de plasma no tempo de 2,5 minutos levou a reduções similares da viabilidade dos biofilmes das cepas de referência e da cepa clínica, sendo estes os tratamentos mais efetivos em comparação ao controle sem tratamento. No entanto, quando foi feita a redução de 50% (10x CIM) para nistatina e anfotericina, os ensaios de associação para ambas as cepas em estudo não foram efetivas ao contrário do tratamento com plasma, que mais uma vez mostrou-se mais efetivo do que os demais tratamentos isoladamente. Esses

resultados diferem dos relatados na literatura, quanto ao efeito do plasma frio aumentando a permeabilidade de células microbianas (Szili et al., 2017; Dong et al., 2017; Brun et al., 2018).

Estudos futuros avaliando o mecanismo pelo qual o jato de plasma interfere quando associado a drogas antifúngicas são importantes. Além disso, estudos são necessários para compreender as reações que podem decorrer dessas associações, incluindo seus efeitos citotóxicos.

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.

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP

UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Prospecção dos mecanismos de ação do jato de plasma frio sob pressão atmosférica sobre *Candida albicans*

Pesquisador: CRISTIANE YUMI KOGA ITO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 83576218.7.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.538.474

Apresentação do Projeto:

O objetivo deste estudo é prospectar os efeitos do jato de plasma sobre a parede celular de *C. albicans*, além de verificar se existem diferenças entre os efeitos sobre as formas leveduriforme e hifal. Perseguindo este objetivo, serão 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 2 cepas clínicas serão expostas ao jato de plasma. A seguir, serão analisadas por espectroscopia no infra-vermelho (FT-IR) e microscopia de força atômica (AFM) para identificar os efeitos do plasma sobre *C. albicans*. Controle negativo (sem exposição) e positivo (caspofungina) serão também analisados. Os dados permitirão uma análise topográfica e da composição química das células. Os ensaios serão realizados em triplicata em três experimentos independentes e a análise estatística será realizada ao nível de significância de 5 %

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo geral do estudo é prospectar os mecanismos de ação do jato de plasma frio sob

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
 Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
 UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
 Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS



Continuação do Parecer: 2.538.474

pressão atmosférica sobre *C. albicans*, analisando seus efeitos sobre a parede celular fúngica.

Objetivo Secundário:

Utilizar técnicas microscópicas, como microscopia 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;

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;

Utilizando a associação entre MEV, AFM e FT-IR, avaliar se há diferença da ação do plasma sobre a parede da célula fúngica em forma de hifa e levedura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não existe riscos envolvidos, já que não haverá coleta de amostras biológicas de indivíduos. Os isolados clínicos foram previamente coletados e identificados em estudo anterior Crastechini et al. (2009) (aprovação CEPH 070/2008).

Benefícios:

Não existem benefícios diretos envolvidos. Os benefícios serão gerados a partir dos resultados obtidos e possibilidade da proposição de uma nova alternativa terapêutica aos pacientes com candidose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Já possui aprovação prévia do Comitê de Ética para a coleta em humanos, dos microorganismos que serão alvo de testes nesta pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequada

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto atende princípios éticos

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer da relatora.

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS



Continuação do Parecer: 2.538.474

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1077172.pdf	15/02/2018 13:28:39		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoSabrinaFAPESPMestradoFINAL. pdf	15/02/2018 13:28:23	CRISTIANE YUMI KOGA ITO	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoSabrina.pdf	15/02/2018 13:27:22	CRISTIANE YUMI KOGA ITO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 12 de Março de 2018

Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador)

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br