



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

SABRINA DE MOURA ROVETTA NOGUEIRA

**EFEITOS DE LÍQUIDOS ATIVADOS COM PLASMA
ATMOSFÉRICO SOBRE *Candida albicans***

2024

SABRINA DE MOURA ROVETTA NOGUEIRA

**EFEITOS DE LÍQUIDOS ATIVADOS COM PLASMA
ATMOSFÉRICO SOBRE *Candida albicans***

Tese 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 DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

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

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa

São José dos Campos

2024

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2024]. 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).

Nogueira, Sabrina de Moura Rovetta

Efeitos dos líquidos ativados com plasma atmosférico sobre *Candida albicans* / Sabrina de Moura Rovetta Nogueira. - São José dos Campos : [s.n.], 2024.

83 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2024.

Orientador: Cristiane Yumi Koga Ito

Coorientador: Rodrigo Sávio Pessoa

1. Líquido ativado com plasma. 2. Gliding arc. 3. *Candida albicans*. 4. Gases em plasma. I. Ito, Cristiane Yumi Koga, orient. II. Pessoa, Rodrigo Sávio, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Felipe de Souza Miranda

Instituto Tecnológico de Aeronáutica

Engenharia Aeronáutica e Mecânica

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Laura Soares Souto Lepesqueur

Faculdade São Leopoldo Mandic

Profa. Associada. Fernanda Lourenção Brighenti

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Campus Araraquara

Profa. Tit. Janete Dias Almeida

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 01 de março de 2024.

DEDICATÓRIA

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

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

Aos meus pais por sempre ter incentivado os meus estudos, a toda a minha família, por me incentivar e acreditar nesse sonho.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

À minha orientadora Profa Tit. Cristiane Yumi Koga-Ito, por absolutamente tudo, por acreditar em mim, ter sempre palavras sábias e motivadoras em momentos que não eram favoráveis. Obrigada por ser amiga e humana, compreender as limitações humanas, obrigada por me inspirar todos os dias como pessoa e profissional.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa por toda atenção e carinho e assistência na execução deste projeto, principalmente por ter sido o suporte em toda a parte experimental dos líquidos ativados com plasma (LAPS).

À Assistente de Suporte Acadêmico Clélia Aparecida de Paiva, pela amizade, ouvido, risadas, pelas palavras, pelo incentivo de não deixar eu desistir, simplesmente por insistir, vá em frente, e por fim, não menos importante por todos os repiques e meios de cultura plaqueados (e foram muitos), todo o *background* da parte experimental microbiológica,

Ao Dr. Felipe Miranda e a aluna de iniciação científica Micaela Shiotani do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA), por toda a sua atenção e ajuda com a parte experimental da LAPs.

A todos os colegas do laboratório Genoma por suas contribuições relevantes que ajudaram a aprimorar a tese.

Ao aluno de doutorado Diego Moraes por toda a ajuda experimental e técnica na execução das análises de citotoxicidade.

Ao meu esposo Otávio Augusto, que esteve sempre comigo em todas as horas importantes da minha vida, sempre me incentivando, apoiando, elogiando, estimulando e principalmente me ouvindo. Muito obrigada por estar junto comigo neste desafio, inclusive por ter ajudado na parte experimental desse trabalho, que sem você não teria sido possível realizar, muito obrigada, te amo.

A minha mãe por sempre ter me incentivado a estudar desde criança, comprando livros, almanaques de atividades de passatempo, gibis, contando histórias que faziam minha imaginação ir além, me ajudando com as tarefas da escola, tomando meus ditados para as provas.

A toda a minha família, meu pai, Simone, sogros, tias, vós e vô por acreditarem em mim me apoiarem incondicionalmente nesta fantástica jornada em busca do conhecimento.

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

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Obtenção e caracterização dos líquidos ativados com plasma (LAP)	20
3.2 Quantificação de espécies reativas nos líquidos ativados com plasma	23
3.2.1 Quantificação por espectrofotometria	23
3.2.2 Quantificação por tiras reativas	24
3.3 Análise físico-química dos líquidos ativados com plasma e controles	25
3.4 LAPs: transporte, armazenamento e estabilidade	26
3.5 Cepas e Condições de Crescimento	28
3.6 Efeito dos LAPs sobre células planctônicas de <i>C. albicans</i>	29
3.7 Efeito dos LAPs sobre biofilmes de <i>C. albicans</i>	30
3.8 Ensaio de citotoxicidade dos líquidos ativados	32
3.9 Análise dos Dados	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Avaliação físico-química dos líquidos ativados por plasma	34

4.2 Avaliação das espécies reativas formadas durante a ativação dos líquidos por plasma	37
4.2.1 Análise por espectroscopia	37
4.2.2 Análise por fitas reativas	42
4.3 Determinação da ação inibitória de água destilada ativada por plasma frente células planctônicas de <i>C. albicans</i>	44
4.3.1 Determinação da ação inibitória de água destilada ativada com plasma com diferentes gases na vazão de 1,5 l/min frente a <i>C. albicans</i>	44
4.3.2 Determinação da ação inibitória da água destilada após 1 dia de ativação com plasma com diferentes gases na vazão de 3,0 l/min frente a <i>C. albicans</i> com 10 minutos de exposição.....	45
4.3.3 Determinação da ação inibitória da água destilada após 1 dia de ativação com plasma com diferentes gases na vazão de 3,0 l/min frente a <i>C. albicans</i> com 30 minutos de exposição	46
4.4 Determinação da ação inibitória de solução salina 0,9% ativada por plasma frente células planctônicas de <i>C. albicans</i>	49
4.4.1 Determinação da ação inibitória da solução salina 0,9% após 1 dia de ativação com plasma formado a partir de diferentes gases na vazão de 3,0 l/min frente a <i>C. albicans</i> com 10 minutos de exposição.....	49
4.4.2 Determinação da ação inibitória da solução salina 0,9% após 1 dia de ativação com plasma com diferentes gases na vazão de 3,0 l/min frente a <i>C. albicans</i> com 30 minutos de exposição	50
4.5 Determinação da ação inibitória dos líquidos ativados por plasma frente biofilmes de <i>C. albicans</i> com 30 minutos de tratamento	53
4.5.1 Determinação ação sobre biofilmes de 24 e 48 da água destilada ativada com plasma de argônio.....	53
4.5.1 Determinação ação sobre biofilmes de 24 e 48 da solução salina 0,9% ativada com plasma de argônio.....	54

4.6 Avaliação de citotoxicidade imediata e citotoxicidade após 24 horas dos líquidos ativados com plasma	55
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

D1	Água destilada ativada com plasma de Argônio
D2	Água destilada ativada com plasma de Argônio e ar comprimido
D3	Água destilada ativada com plasma de ar comprimido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ERONS	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
HNO ₃	Ácido nítrico
LAP	Líquidos ativados com plasma
NO ⁻²	Nitrito
NO ⁻³	Nitrato
O ₃	Ozônio
ONOOH	peroxinitrito
ORP	Potencial de oxirredução
pH	Potencial hidrogeniônico
σ	Condutividade elétrica
S1	Solução salina 0,9 ativada com plasma de Argônio
S2	Solução salina 0,9 ativada com plasma de Argônio e ar comprimido
S3	Solução salina 0,9 ativada com plasma de ar comprimido
TDS	Total de sólidos dissolvidos

Nogueira SMR. Efeitos dos líquidos ativados com plasma atmosférico sobre *Candida albicans* [Tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2024.

RESUMO

O incremento no número de casos refratários aos tratamentos convencionais e a limitação de opções terapêuticas são alguns dos desafios encontrados no tratamento da candidose bucal, apontando para a necessidade de terapias alternativas. A utilização da tecnologia de plasma de forma indireta, pela exposição prévia de líquidos *ex situ*, tem mostrado resultados promissores, trazendo inúmeras vantagens para a aplicação clínica. Até o momento, pouco se conhece sobre a atividade antifúngica do líquido ativado com plasma (LAP) e não foram detectados relatos sobre sua aplicabilidade no tratamento da candidose bucal. Com base neste cenário, o objetivo deste projeto foi avaliar a atividade do líquido ativado com plasma sobre *Candida albicans*, principal agente etiológico da candidose bucal. Para tanto, foram determinadas as condições de obtenção do LAP com maior efeito antifúngico frente a *C. albicans*. O LAP foi gerado em um reator de plasma tipo arco deslizante (*gliding arc*). Os gases empregados incluíram argônio, ar comprimido seco e suas misturas em diversas concentrações, ajustando-se o fluxo de gás e a potência conforme necessário. Avaliou-se a eficácia antifúngica de diferentes líquidos ativados contra *C. albicans*, tanto em estado planctônico quanto em biofilmes, visando identificar o mais efetivo. As espécies reativas dos LAP foram caracterizadas utilizando técnicas espectrofotométricas, juntamente com a avaliação dos parâmetros físico-químicos. Os resultados dos ensaios foram submetidos a análise estatística, estabelecendo-se um nível de significância de 5% para a interpretação dos dados. Observou-se que a solução salina 0,9% ativada com plasma de argônio (S1), água destilada ativada com plasma de argônio (D1) e água destilada ativada com a mistura dos gases argônio e ar comprimido (S2) apresentaram a maior atividade antifúngica sobre células planctônicas de *C. albicans* quando expostas por 30 minutos ao LAP. O grupo D1 apresentou maior ação frente aos biofilmes de 24 e 48 horas e o S1 frente a biofilmes de 48 horas apenas quando exposto por 30 minutos ao LAP. Ambos os LAPs apresentaram ação antifúngica após terem sido congelados e armazenados por 1 dia após a ativação. Os grupos D1 e S1 não apresentaram perfil citotóxico nos ensaios realizados. Pode-se concluir que os LAPs apresentaram ação inibitória sobre células planctônicas e sobre biofilmes de *C. albicans*, sem citotoxicidade para células de mamíferos, sugerindo seu potencial como adjuvante às terapias para o controle da candidose.

Palavras-chave: Líquido ativado com plasma. Gliding arc. *Candida albicans*.
Gases em plasma.

Nogueira SMR. Application of plasma activated liquids on Candida albicans [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2024.

ABSTRACT

The increase in the number of cases refractory to conventional treatments and the limitation of therapeutic options is due to some two challenges encountered in the treatment of oral candidiasis, pointing to the need for alternative therapies. The use of plasma technology indirectly, for the exposition of liquids *ex situ*, has shown promising results, providing numerous advantages for clinical application. Currently, little is known about the antifungal activity of plasma-activated liquid (LAP) and there are no reports on its applicability in oral candidiasis treatment. Based on this scenario, the objective of this project is to validate the application of plasma-activated liquid as an adjuvant in the treatment of oral candidiasis. Therefore, certain conditions for obtaining LAP have greater antifungal effect against Candida albicans. The LAP was generated in a gliding arc type plasma reactor. The gases used include argon, dry compressed and their mixtures in various concentrations, adjusting the gas flow and power as necessary. The antifungal efficacy of different liquids activated against C. albicans is evaluated, both in the planktonic state and in biofilms, aiming to identify the most effective. The relative species of LAP were characterized using spectrophotometric techniques, together with the evaluation of two physical-chemical parameters. The results of two tests were submitted to statistical analysis, establishing a significance level of 5% for the interpretation of the data. It was observed that the groups that presented the greatest antifungal activity in planktonic cells of C. albicans were the groups of 0.9% saline solution activated with argonium plasma (S1), or of distilled water activated with argonium plasma (D1). e or distilled water activated with a mixture of two argon gases and compressed air (S2). The D1 group presented against biofilms of 24 and 48 hours and the S1 against biofilms of only 48 hours. Both LAPs are presented with antifungal coating and have been frozen and stored for 1 day after activation. The groups D1 and S1 do not present a cytotoxic profile in the tests carried out. It can be concluded that the LAPs have antifungal activity on planktonic cells and on biofilms and do not present a toxicity profile for human cells, being potent adjuvants in therapies for or controlling infections caused by C. albicans.

Keywords: Plasma activated liquid. Gliding arc. Candida albicans. Plasma.

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia plasma tem sido estudada e utilizada extensamente na esterilização de equipamentos médicos, indústria alimentícia, tratamento de superfícies, esterilização de grãos, esterilização interna de embalagens previamente seladas, na indústria têxtil e automotiva, assim como no tratamento de águas (Belgacem et al., 2017; Hadinoto et al., 2023; Han et al., 2023; Hoffmann et al., 2013; Konchekov et al., 2023; Laroussi et al., 2003; Narasimhan et al., 2023; Neyts, Brault, 2017; Reema et al., 2022; Xu et al., 2023).

Diferentes áreas do conhecimento vem desenvolvendo inúmeros estudos com aplicações em áreas como a energética, a fotônica, a comunicação, a exploração espacial, a física/química de materiais e com um papel em destaque às áreas médicas (Belgacem et al., 2017; Laroussi, 2018; Mohades et al., 2017; Neyts, Brault, 2017; Reiazi et al., 2017; (Bai et al., 2023; Hoppanová, Kryštofová, 2022; Ma et al., 2023). Grupos multidisciplinares sob esforços conjuntos da engenharia, física, química, biologia, odontologia e medicina, entre outros, têm produzido evidências in vitro e in vivo da eficácia e da aplicabilidade desta tecnologia, no tratamento não invasivo e indolor, de infecções persistentes a diversos tipos de câncer (Dobrynin et al., 2009; Hoffmann et al., 2013; Laroussi, 2018; Lee et al., 2016; Mohades et al., 2017; Chiappim et al., 2021b, 2021a; Faramarzi et al., 2021; Malyavko et al., 2020; Milhan et al., 2022; Pang et al., 2022; Sampaio et al., 2022; Bauer, 2019; Kim, Kim, 2021)

O plasma é conceituado como um gás parcialmente ionizado que é composto por elétrons, íons, espécies excitadas, radicais livres e fótons, cuja produção ocorre devido a ação de campos eletromagnéticos gerados por fontes de micro-ondas, radio frequência, corrente contínua ou alternada em gases nobres

(argônio ou hélio) ou moleculares (oxigênio, nitrogênio, etc.) (Bourke et al., 2017; Gates, 2018; Kong et al., 2009; Neyts, Brault, 2017). Laroussi, 1996 foi o primeiro a relatar o efeito bactericida do plasma frio, liderando desde então um expressivo número de artigos que abordam sobre seu potencial antimicrobiano ((Borges et al., 2019; Chiappim et al., 2021a; Joshi et al., 2010; Mai-Prochnow et al., 2016; Mohd Nasir et al., 2016; Rothwell et al., 2022; Vlad et al., 2019a; Wiegand et al., 2017; Yang et al., 2021)) e investigando os mecanismos físicos e químicos envolvidos no processo terapêutico da técnica (Aparecida Delben et al., 2016a; Bourke et al., 2017; Coughlan et al., 2016; Koban et al., 2010; Kong et al., 2009; Lunov et al., 2017; Neyts, Brault, 2017; Wertheimer, Coulombe, 2012; Zhao et al., 2020; Rovetta-Nogueira et al., 2023). Mais recentemente, a utilização da tecnologia do plasma de forma indireta, pela exposição de líquidos ao plasma tem sido explorada com resultados promissores (Hadinoto et al., 2023b; Hu et al., 2022; Tampieri et al., 2023). O efeito antimicrobiano da água ativada com plasma (plasma activated water, LAPS) frente a *Escherichia coli* foi associado à geração de condições oxidantes (Shaw et al., 2018). De um modo geral, o plasma ao interagir com líquidos ou soluções permite a geração de peróxido de hidrogênio, nitritos, nitratos e outros, que tem capacidade de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) células (Matějka et al., 2023; Shaji et al., 2023; Takeda et al., 2017; Tampieri et al., 2023; Wong et al., 2023). Esta tecnologia tem sido recentemente avaliada para aplicações médicas com resultados muito promissores. Neste caso, não existe aplicação direta do LTAPP no sítio clínico, mas somente do líquido tratado, o que traz inúmeras vantagens na aplicação clínica e abre novas possibilidades para o uso do plasma. Bhatt et al., 2018 reportaram o sucesso da utilização de solução ativada com plasma sobre biofilmes de MRSA, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, sugerindo a sua aplicação em terapia lock, em casos de infecções de catéteres.

Outra propriedade marcante do plasma e determinante para o tratamento de infecções é a capacidade em causar dano à célula procariótica mantendo a integridade de células eucarióticas (Dobrynin et al., 2009; Faramarzi et al., 2021; Lunov et al., 2017; Mai-Prochnow et al., 2016, 2015; Weltmann, Von Woedtke, 2017). Essa propriedade é baseada no metabolismo celular para espécies reativas de oxigênio (ERO) que não é igual para ambas uma vez que eucariotos possuem proteção para espécies como O_2^- , por exemplo, enquanto células procarióticas não possuem proteção ou tem baixa resistência (Dobrynin et al., 2009; Faramarzi et al., 2021; Gorbanev et al., 2016; Malyavko et al., 2020; Xu et al., 2015). A diferença de tamanho entre as células também oferece seletividade visto que células bacterianas oferecem maior superfície em relação ao volume para ação do plasma, estando na ordem de 0,2 a 10 μm , enquanto a célula eucariótica apresenta tamanho variável de 10 a 100 μm (Dobrynin et al., 2009; Gorbanev et al., 2016; Kong et al., 2009; Xu et al., 2015).

A incidência de infecções fúngicas tem aumentado significativamente nas últimas décadas (Mount et al., 2018). Em particular, as infecções por leveduras do gênero *Candida* são consideradas um problema relevante nas áreas médicas (Dadar et al., 2018). Essas infecções podem ser superficiais e sistêmicas (Williams et al., 2013). As infecções sistêmicas ocorrem quando o fungo supera a barreira epitelial e atinge a circulação sanguínea, causando a candidemia (Gow et al., 2012), a qual apresenta taxas de mortalidade de 30% (Keighley et al., 2023) até 50% (Omrani et al., 2014).

As candidoses bucais apresentam grande relevância pois ocorrem em altas prevalências dentre pacientes imunocomprometidos (Low et al., 2016; Ouchi et al., 2024) e são consideradas como porta de entrada para infecções sistêmicas (Williams et al., 2013). Casos refratários aos tratamentos convencionais têm sido relatados na literatura com prevalência crescente (Shah et al., 2017; Wang et al.,

2016).

A ocorrência crescente de resistência antifúngica, a toxicidade e interação com outras drogas, além do pequeno espectro de ação dos fármacos antifúngicos existentes, limita o número de alternativas terapêuticas para a candidose (Feng et al., 2023; Iyer et al., n.d.; Jabeen et al., 2023; Lewis, Graybill, 2008; Lin et al., 2023; Zhang et al., 2024). Neste contexto, a tecnologia do plasma é promissora no tratamento de infecções fúngicas devido às limitações clínicas associadas aos antifúngicos, como toxicidade elevada e resistência das cepas aos antifúngicos (Feng et al., 2023; Wu et al., 2023).

Além disso, a maior resistência da forma de biofilme em relação às células planctônicas tem sido alvo de estudos (Fan et al., 2022; Zhang et al., 2024). Relata-se que os biofilmes podem ser até 1.000 vezes mais resistentes do que no estado planctônico (Mai-Prochnow et al., 2015). Desta forma, a busca por novas formas de tratamento é urgentemente necessária (Feng et al., 2023; Keighley et al., 2023; Wu et al., 2023)

O efeito inibitório do jato de plasma sobre *Candida albicans* foi relatado em estudos anteriores (Aparecida Delben et al., 2016b; Kostov et al., 2015; Nishime et al., 2017; Doria et al., 2015; Rovetta-Nogueira et al., 2023; Chiodi Borges et al., 2017; He et al., 2020; Schnabel et al., 2020; Wanachantararak et al., 2019).. Borges et al., 2017 relataram efeito do jato de plasma de hélio sobre biofilmes de *C. albicans* em aplicações a partir de 5 min. Efeitos promissores sobre a aderência e capacidade de filamentação também foram observados. A utilização do jato de plasma em modelo de candidose oral murino, mostrou efeito positivo devido às ações anti-inflamatórias e antifúngicas, com baixa toxicidade aos tecidos (Borges et al., 2018).

Segundo Liu et al., 2020 e Ma et al., 2020, uma das maiores vantagens dos LAPs em relação à aplicação direta do plasma sobre tecidos biológicos, por

exemplo, é a segurança, uma vez que, os perigos do campo elétrico, partículas altamente carregadas e danos térmicos aos tecidos podem ser evitados, apenas utilizando a ação das espécies reativas produzidas (Ercan et al., 2013; Liu et al., 2020b; Zhou et al., 2018).

Apesar das vantagens atribuídas a aplicação dos líquidos ativados com plasma, até o presente momento poucos estudos foram realizados com *Candida albicans* (Ercan et al., 2013; Laurita et al., 2015; Miranda et al., 2023a; Sampaio et al., 2022), e dentre os trabalhos diversos autores tiveram dificuldades em encontrar parâmetros antifúngicos efetivos, apenas Laurita et al., 2015 encontrou parâmetros que foram efetivos frente *C. albicans*, utilizando uma fonte de plasma denominada DBD (descarga por barreira dielétrica), o que demonstra que ainda existe um caminho a ser percorrido na padronização de parâmetros físico-químicos uma vez que existem diferente tipos de fontes de plasma.

Assim, o objetivo deste trabalho é estudar os efeitos dessa nova forma de entrega do plasma sobre *C. albicans* como futuro adjuvante no controle de infecções fúngicas.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral foi avaliar os efeitos de líquidos ativados com plasma sobre *Candida albicans*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Gerar e caracterizar diferentes líquidos ativados com plasma (LAPs);
- b) Determinar as condições físicas ideais dos LAPs para a atividade antifúngica sobre *C. albicans*;
- c) Determinar as espécies reativadas formadas nos LAPs;
- d) Avaliar os possíveis efeitos tóxicos para células de mamíferos dos LAPs nos parâmetros efetivos frente a *C. albicans*.

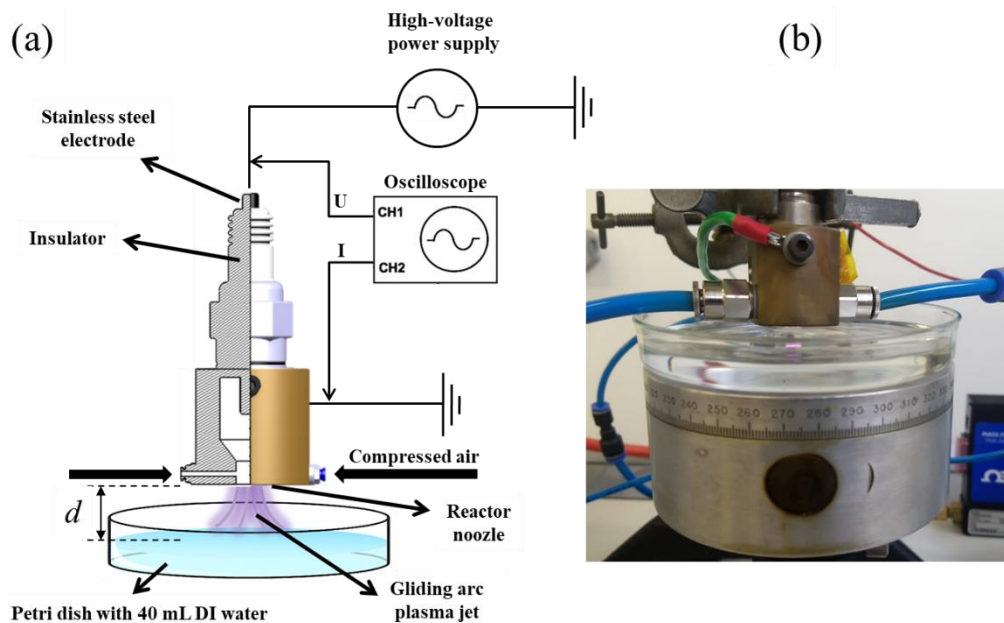
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e caracterização dos líquidos ativados com plasma (LAP)

O conjunto experimental para o jato de plasma de arco deslizante (GAPJ) consistiu em um reator de plasma, uma fonte de alimentação de alta tensão, um osciloscópio, uma fonte de gás e um suporte para o substrato, conforme ilustrado na Figura 1. O plasma foi gerado dentro de um reator de fluxo de vórtice direto (FVFR). A distância entre o reator e o substrato, que consistia em diferentes líquidos, foi mantida em 0,5 cm. Em cada experimento, tratou-se uma quantidade de líquido de 40 mL. O equipamento experimental de jato de plasma do arco deslizante (GAPJ) foi composto por reator de plasma, uma fonte de alimentação de alta tensão, um osciloscópio, fonte de gás, e de um suporte para o substrato (Figura 1).

O jato de plasma foi gerado em um reator de fluxo de vórtice direto (FVFR). A distância do reator e do substrato (diferentes líquidos) foi de 0,5 cm. A quantidade de líquido tratado em cada ensaio foi de 40 ml. O tempo de ativação dos líquidos foi de 30 minutos.

Figura 1 - Equipamento de plasma gerador do líquido ativado com plasma (a) representação esquemática e (b) foto do equipamento experimental de jato de plasma *gliding arc*.

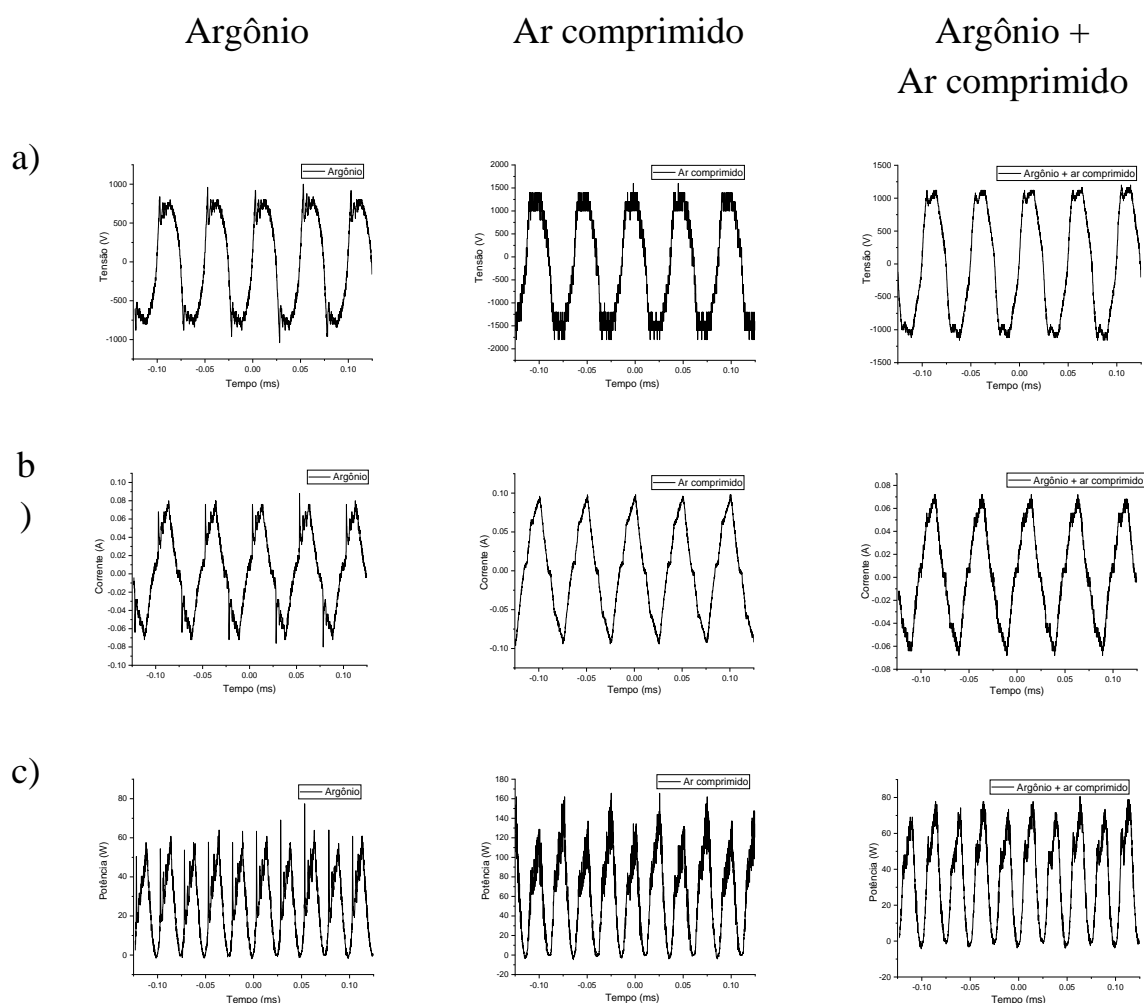


Fonte: Pessoa et al., 2023.

Neste estudo, foram empregadas duas fontes de gás: Argônio (99,5%) e ar comprimido, sendo este último fornecido por um compressor de ar Schulz CSD 9/50 (Joinville, SC, Brasil). Inicialmente, ambos os gases foram utilizados em uma vazão de 1,5 L/min, individualmente e em mistura, mantendo-se a proporção de 1,5 L/min para cada gás. Após a análise dos resultados microbiológicos obtidos com essa configuração, procedeu-se a testes adicionais aumentando a vazão para 3,0 L/min para o Argônio, o ar comprimido e a mistura dos dois, padronizando essa vazão para toda a fase experimental. A energia para o sistema foi fornecida por uma fonte de alta tensão (modelo Arternis 0215, Inergiae, Florianópolis, SC, Brasil), operando a uma frequência de 20 kHz. As medições de tensão e corrente da descarga do jato de plasma foram realizadas utilizando uma sonda de alta tensão (Tektronix P6015A, Tektronix, Beaverton, OR, EUA) e uma sonda de corrente ajustável (Agilent N2869B, Agilent, Santa Clara, CA, EUA),

respectivamente. Os sinais elétricos captados foram registrados em um osciloscópio digital (Keysight DSOX1202A, Keysight, Santa Rosa, CA, EUA), com o sinal de corrente sendo inferido diretamente do eletrodo aterrado. As figuras apresentadas (Figura 2) ilustram as formas de onda da tensão e corrente.

Figura 2 – Formas de onda (a) da tensão aplicada no GAPJ; b) da corrente; e c) da potência da descarga para as três químicas de plasma investigadas.



Fonte: Elaborado pela autora.

A partir da Figura 2, onde $V(t)$ é a tensão, $I(t)$ é a corrente elétrica e $(T_2 - T_1)$ é o intervalo de tempo, foi possível determinar a potência média do jato de

plasma, que para o caso do Argônio foi de 25,4 W, Ar comprimido foi 60,6 W, e para Argônio+ar comprimido foi 33,4 W.

Figura 3 – Figura da equação de cálculo da potência dissipada pelo plasma

$$P_{dissip}(W) = \frac{1}{T_2 - T_1} \int_{T_1}^{T_2} V(t)I(t)dt$$

Fonte: Elaborado pela autora.

Os líquidos utilizados para a ativação com plasma foram solução salina 0,9% (preparada em laboratório) e água destilada, obtida através do equipamento Purelab Option-Q, (Elga labwater), antes da ativação por plasma, os LAPs eram esterilizados.

3.2 Quantificação de espécies reativas nos líquidos ativados com plasma

3.2.1 Quantificação por espectrofotometria

Para a detecção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) nos líquidos ativados com plasma (LAPs), utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis (Evolution 201, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). As medições de absorvância foram realizadas na faixa espectral de 190 a 900 nm.

O aparelho foi ajustado para uma resolução espectral de 0,2 nm e uma velocidade de varredura de 120 nm/min. As amostras foram distribuídas em cubetas de quartzo de 3,5 mL (K22-135Q, Kasvi, São José dos Pinhais, SP, Brasil), com caminho óptico de 10 mm e duas faces polidas. Para obter o espectro

de fundo, utilizou-se inicialmente uma cubeta vazia, estabelecendo assim o espectro UV-Vis de referência.

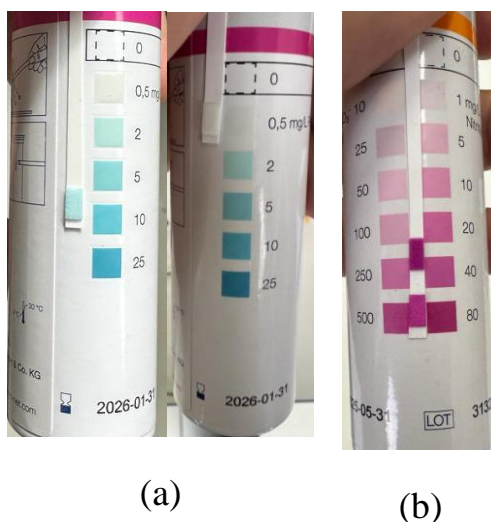
Em seguida, empregou-se uma cubeta contendo 3,5 ml de água deionizada para definir a linha de base, assegurando que as intensidades observadas nos espectros UV-Vis dos LAPs se dessem exclusivamente às RONS. Após estabelecer a linha de base com o espectro de água deionizada, as cubetas foram limpas e preenchidas com alíquotas dos LAPs para a obtenção dos espectros de absorção UV relativos, conforme metodologia descrita por Dasalu et al., 2019. Este procedimento de calibração da linha de base também foi aplicado na quantificação dos LAPs provenientes de solução salina de NaCl 0,9%.

3.2.2 Quantificação por tiras reativas

Após a ativação dos líquidos por plasma com diferentes tipos de gases, foi realizada a análise de quantificação das espécies. Foi utilizado o kit de tiras reativas da marca Quantofix[®] para a quantificação de peróxido de hidrogênio, nitrito e nitrato, sendo que para este último, uma única fita possui indicadores para quantificar ambos os componentes. As fitas foram imersas dentro dos diferentes líquidos por um período de apenas 15 segundos, que é tempo o suficiente para haver reação do líquido com o substrato, de acordo com o fabricante. As fitas de peróxido de hidrogênio podem quantificar valores em uma faixa que varia de 0,5 a 25 mg/L, as fitas de nitrito entre 1 e 80 mg/L e as nitrato avaliam concentrações entre 10 a 500 mg/L.

A leitura foi realizada a partir de um gabarito colorimétrico, onde foi comparada visualmente a concentração da LAPS com a do gabarito, e assim a concentração é determinada como mostra a Figura 4.

Figura 4: Leitura de fitas reativas (a) de peróxido de hidrogênio e (b) de nitrito e nitrato



Fonte: Elaborado pela autora.

A quantificação do ozônio foi realizada utilizando um fotômetro de multiparâmetros da marca *Exact Micro 20* (*Industrial Test System*, EUA) após o período de 5 minutos de leitura um valor preciso foi gerado pelo equipamento.

3.3 Análise físico-química dos líquidos ativados com plasma e controles

Os parâmetros físico-químicos dos líquidos foram mensurados antes e após a ativação dos LAPs, foram avaliados os parâmetros de pH, potencial de oxirredução (ORP), condutividade elétrica e total de sólidos dissolvidos (TDS) utilizando o equipamento pHmetro de bancada Metrohm 913.

3.4 LAPs: transporte, armazenamento e estabilidade

Os líquidos ativados com plasma à base de água destilada e solução salina, foram transportados do Instituto de Tecnológico de Aeronáutica (ITA) até o laboratório Genoma (Unesp) em isopor com gelo.

O período do LAP armazenado em gelo até chegada ao laboratório foi de aproximadamente 3 horas, período entre a obtenção dos LAP, ensaios físico-químicos, espectrofotométricos e de traslado até a chegada ao laboratório microbiológico.

Os LAP foram armazenados em freezer comercial em temperatura de $\pm -18^{\circ}\text{C}$), para realização dos experimentos no dia posterior a sua obtenção.

Os LAPs foram congelados em temperaturas de $\pm -18^{\circ}\text{C}$, em tubos criogênicos de 3 ml. Para descongelar os LAPs contidos nos tubos, estes eram colocados dentro do fluxo laminar e após 15 minutos já estavam descongelados, prontos para o uso, com temperatura ambiente em torno de 16-19 $^{\circ}\text{C}$.

Os LAPs foram divididos em grupos a partir do substrato líquido e do tipo de gás utilizado na sua ativação, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Diferentes líquidos ativados com plasma de argônio, ar comprimido e mistura de ambos os gases a partir de água destilada ou solução salina NaCl 0,9%

Grupos	Água destilada	Grupos	Salina
CD	Não ativado (controle negativo)	CS	Não ativado (controle negativo)
D1	Argônio	S1	Argônio

D2	Argônio e ar comprimido	S2	Argônio e ar comprimido
D3	ar comprimido	S3	ar comprimido

Legenda: CD: água destilada controle, não ativada; D1: água destilada ativada com Argônio; D2: água destilada ativada com Argônio e ar comprimido; D3: água destilada ativada com ar comprimido; CS: salina controle, não ativada; S1: salina ativada com Argônio; S2: salina ativada com Argônio e ar comprimido; S3: salina ativada com ar comprimido.

Fonte: Elaborado pela autora.

Foram avaliados 20 grupos experimentais, sendo 4 grupos iniciais com os diferentes gases na vazão de 1,5 l/min, incluindo o grupo controle. A seguir, foram avaliados 16 grupos experimentais com os diferentes gases na vazão de 3,0 l/min e seus respectivos controles, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Grupos experimentais de líquidos ativados por plasma derivados de água destilada e solução salina 0,9% expostos ao plasma de argônio ou gás comprimido (vazões 1,5 ou 3,0 L/min) em exposições de 10 e 30 minutos. Os líquidos foram avaliados no Dia 1 (dia seguinte à sua ativação)

Dia 1			
	vazão gás 1,5 L/min	vazão gás 3,0 L/min	
EXPOSIÇÃO 30 MIN	CD	CD	CS
	D1	D1	S1
	D2	D2	S2
	D3	D3	S3
EXPOSIÇÃO 10 MIN	-	CD	CS
	-	D1	S1
	-	D2	S2
	-	D3	S3

Legenda: CD: água destilada controle, não ativada; D1: água destilada ativada com Argônio; D2: água destilada ativada com Argônio e ar comprimido; D3: água destilada ativada com ar comprimido; CS: salina controle, não ativada; S1: salina ativada com Argônio; S2: salina ativada com Argônio e ar comprimido; S3: salina ativada com ar comprimido.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.5 Cepas e Condições de Crescimento

Neste estudo, foi utilizada a cepa de referência de *Candida albicans* ATCC 18804, a qual estava armazenada em caldo Sabouraud, com 20% de glicerol, a - 80 °C.

Os inóculos utilizados para avaliar os efeitos dos LAPs sobre células planctônicas e biofilmes foram obtidos a partir de culturas, cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (SD), a 37°C por 24 horas, em aerobiose. Essas células foram suspensas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%). Cada técnica, devido às características, experimentais, necessitou de uma concentração celular diferente, como mostra a Tabela 3.

Os inóculos foram padronizados com o auxílio de um espectrofotômetro (λ : 550 nm), com diferentes densidades ópticas (DO) (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentrações celulares utilizadas para avaliação do efeito dos líquidos ativados sobre células planctônicas e biofilmes (λ : 550 nm)

Técnicas	Concentração celular	Densidade Óptica (DO)
Viabilidade células planctônicas	10 ⁶ células/ml	0,380
Viabilidade biofilmes	10 ⁷ células/ml	0,830

Fonte: Elaborado pela autora.

3.6 Efeito dos LAPs sobre células planctônicas de *C. albicans*

Alíquotas de 1 ml da suspensão contendo 10⁷ UFC/ml foi transferida para tubos cônicos, e submetidos a centrifugação a 1500 rpm por 15 minutos.

Retirou-se o sobrenadante e o *pellet* formado no fundo dos tubos foi colocado em contato com 1 ml do LAP a ser avaliado. Os LAPs foram avaliados individualmente, conforme descrito na (Tabela 1), incluindo os controles com água destilada e salina estéreis não ativados.

Após adição dos LAPs, utilizou-se o vórtex para homogeneizar as suspensões. As células de *C. albicans* foram expostas aos diferentes LAPs por 10 minutos ou 30 minutos.

Decorrido o tempo de exposição, a suspensão foi novamente agitada em vórtex, e 100 µl foi transferido para um tubo cônico contendo 900 µl solução salina 0,9% para início da diluição seriada.

Realizou-se diluição em série (10⁻¹ até 10⁻⁶), e as três últimas diluições nas concentrações de 10⁻³ a 10⁻⁵ foram plaqueadas pela técnica de Miles e Misra (1931) em ágar Saboraud. Após incubação por 24 horas, realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônia após incubação por 24 horas. Foram calculados os valores de UFC ml⁻¹.

3.7 Efeito dos LAPs sobre biofilmes de *C. albicans*

3.7.1 Efeito dos líquidos ativados com plasma sobre biofilmes de 24 horas

Foram realizados ensaios de biofilme com os grupos D1 e S1, que foram os LAPs que apresentaram os melhores valores de redução de UFC/ml nos ensaios com células planctônicas. Além disso, foram incluídos controles com água destilada e salina 0,9% estéreis não ativados. Foram realizados três ensaios em dias diferentes, com um total de quatro amostras.

A cada um dos poços foi adicionado 250 µl do inóculo fúngico, a placa foi incubada no agitador-incubadora (C24) por 90 minutos, pra pré-adesão do biofilme a 75 rpm por 37°C, decorrido o período o sobrenadante foi desprezado e os poços lavados com solução salina 0,9% para remoção de células não aderidas. A solução salina utilizada na lavagem foi removida e desprezada, e então, acrescentou 250 µl do meio de cultura líquido, caldo RPMI.

Após as 24 horas, o sobrenadante foi removido dos poços e os mesmos foram lavados, após a lavagem acrescentou-se soluções teste aos poços. O tempo de contato foi de 30 minutos.

Decorrido esse período, os fundos dos poços foram raspados com a ponta de ponteira de micropipeta estéril, para a remoção do biofilme aderido. A seguir, foi realizada a homogeneização da suspensão com o auxílio da pipeta automática, em movimento de *up and down* por 5 vezes. Desta suspensão, 100 µl foi transferido para um tubo cônico contendo 900 µl solução salina 0,9% para início da diluição seriada. Realizou-se diluição em série (10^{-1} até 10^{-6}), e as três últimas

diluições nas concentrações de 10^{-3} a 10^{-5} foram plaqueadas pela técnica de Miles e Misra (1931), em ágar Saboraud. Após 24 horas, o número de colônias foi contado e o valor de unidades formadoras de colônia foi obtido. A seguir, foi calculado o valor de UFC ml^{-1} .

3.7. Efeito dos líquidos ativados com plasma sobre biofilmes de 48 horas

Foram realizados ensaios de biofilme com os grupos D1 e S1, que foram os LAPs que apresentaram os melhores valores de redução de UFC/ml nos ensaios com células planctônicas. Além disso, foram incluídos controles com água destilada e salina 0,9% estéreis não ativados. Foram realizados três ensaios em dias diferentes, com um total de quatro amostras.

A cada um dos poços foi adicionado 250 μl do inóculo fúngico, a microplaca foi incubada no agitador-incubadora (C24) por 90 minutos, para a pré-adesão do biofilme a 75 rpm por 37°C , decorrido o período o sobrenadante foi desprezado e os poços lavados com solução salina 0,9% para remoção de células não aderidas. A solução salina utilizada na lavagem foi removida e desprezada, e então, acrescentou-se 250 μl do meio de cultura líquido, caldo RPMI (pH 7,0).

Após as 24 horas, o sobrenadante foi removido dos poços e os mesmos foram lavados, após a lavagem com solução salina 0,9% acrescentou novamente 250 μl de caldo RPMI, e a placa foi novamente incubada por mais 24 horas, no agitador-incubadora, sob os mesmos parâmetros já descritos.

Após as 48 horas, o sobrenadante foi removido dos poços e os mesmos foram lavados, após a lavagem com solução salina 0,9% estéril, acrescentou-se soluções teste aos poços. O tempo de contato foi de 30 minutos. Decorrido esse período, os fundos dos poços foram raspados com a ponta de ponteira de

micropipeta estéril, para a remoção do biofilme aderido. A seguir, foi realizada a homogeneização da suspensão com o auxílio da pipeta automática, em movimento de *up and down* por 5 vezes. Desta suspensão, 100 µl foi transferido para um tubo cônico contendo 900 µl solução salina 0,9% para início da diluição seriada. Realizou-se diluição em série (10^{-1} até 10^{-6}), e as três últimas diluições nas concentrações de 10^{-3} a 10^{-5} foram plaqueadas pela técnica de Miles e Misra (1931), em ágar Saboraud. Após 24 horas, o número de colônias foi contado e o valor de unidades formadoras de colônia foi obtido. A seguir, foi calculado o valor de UFC ml⁻¹.

3.8 Ensaio de citotoxicidade dos líquidos ativados

A avaliação da citotoxicidade dos líquidos ativados foi realizada de acordo com a ISO 10993-5:2009 e a metodologia descrita por Sampaio et al 2022. Utilizou-se células derivadas de rim de macaco *Cercopithecus aethiops* (células Vero), as quais foram cultivadas em meio modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado com 1% de penicilina (100U/mL)/estreptomicina (100 mg/mL) e 10% de soro fetal bovino (FBS). As células foram cultivadas a 37°C em 5% de CO₂. A densidade de 8×10^3 células/poço foi semeada em placas de 96 poços. As placas de 96 poços foram incubadas por 24 horas para promover a adesão celular. Os líquidos foram expostos às células na proporção de 1:1 (líquido/meio de cultura), sendo 200 µL de solução total em cada poço. Os grupos analisados foram água destilada e solução salina 0,9% estéreis não ativadas (grupo controle negativo) e água destilada e solução salina 0,9% ativadas por plasma de argônio por 30 minutos com fluxo de gás de 3,0 l/min, estéreis. Controle de crescimento cultivado apenas com o meio de cultura também foi incluído. Após 30 min de

contato, as soluções-teste foram removidas. O tempo de contato entre os líquidos e as células foi definido como o maior tempo analisado durante os testes microbiológicos. As células foram lavadas com solução salina balanceada de Hanks (HBSS) e reincubadas por 24 h com meio de cultura fresco.

A viabilidade celular foi avaliada com o teste de citotoxicidade MTT. Decorridas 24 horas, o meio de cultura foi removido e 100 µL de brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas por 2h. Em seguida, adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) a cada poço e colocou-se num agitador durante 15 minutos para dissolver os cristais de formazan. A densidade óptica resultante da solução foi medida a 570 nm num espectrofotômetro. Os dados de absorbância foram normalizados para o grupo de controle de crescimento (=100%). Seis repetições foram realizadas em dois experimentos independentes (n = 12). A viabilidade celular abaixo de 70% foi considerada citotóxica, de acordo com a ISO 10993-5:2009.

3.9 Análise dos Dados

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o software Origin Lab 8.5. Realizaram-se os testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e Análise de Variância – ANOVA One Way (post hoc Tukey's Test), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação físico-química dos líquidos ativados por plasma

A avaliação dos parâmetros físico-químicos mostrou que, os pHs de todos os grupos experimentais sofreram redução após a ativação por plasma (Tabela 4).

Nos grupos S3 e D3, ativados com plasma de ar comprimido, a redução foi mais expressiva, enquanto que nos grupos ativados apenas com o plasma de Argônio a redução do pH ocorreu, mas foi menor do que nos grupos S3 e D3. Os grupos D2 e S2, ativados por plasma de Argônio e ar comprimido também tiveram os pH com valores reduzidos, provavelmente influenciados pela presença do ar comprimido. O valor de total de sólidos dissolvidos (TDS), assim como a condutividade elétrica e o potencial de oxirredução (ORP) aumentaram em todos os grupos após a ativação, e observou-se que estes parâmetros apresentaram um perfil inverso ao do pH que reduz após ativação, enquanto estes aumentaram, isso em todas as LAPs tanto de água destilada quanto de solução salina 0,9%, ilustrados pela Figura 5.

Tabela 4 – Parâmetros físico-químicos dos líquidos antes e após ativação por plasma gerados a partir de diferentes gases e vazões.

Grupos		pH	TDS	ORP	σ
Vazão 1,5 l/min	DC	6,86	25,95 mg/L	37,2 mV	52 μ S/cm
	D1	6,19	43,90 mg/L	76,8 mV	125,9 μ S/cm
	D2	6,20	44,56 mg/L	125,8 mV	155,8 μ S/cm
	D3	5,77	57,89 mg/L	157,2 mV	215,15 μ S/cm

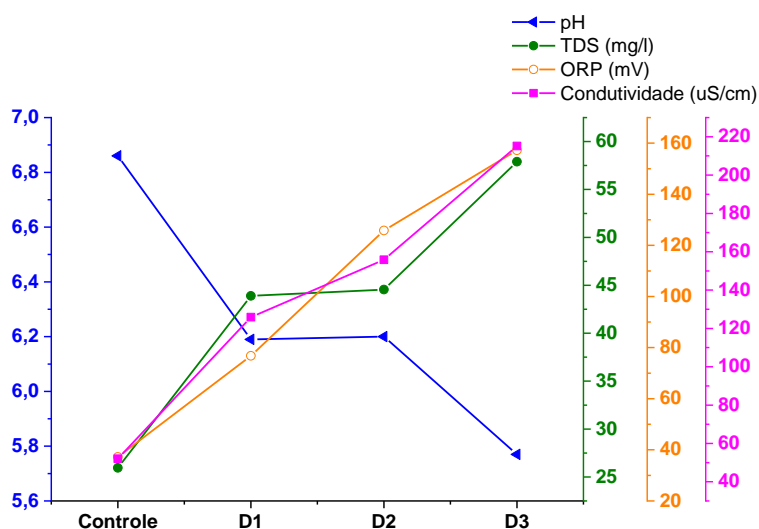
Vazão 3,0/min	SC	4,73	42553 mg/L	123,1 mV	107,2 mS/cm
	S1	4,24	44401 mg/L	153,7 mV	111,1 mS/cm
	S2	2,56	52827 mg/L	251,9 mV	130,1 mS/cm
	S3	2,47	53027 mg/L	257,2 mV	126,7 mS/cm
Vazão 3,0 l/min	DC	5,8	26,76 mg/L	51 mV	58 μ S/cm
	D1	4,05	137,50 mg/L	149,4 mV	275,5 μ S/cm
	D2	2,96	166,8 mg/L	229,7 mV	405,5 μ S/cm
	D3	2,82	159,9 mg/L	237,7 mV	384,5 μ S/cm

Legenda: TDS: Total de sólidos dissolvidos; ORP: Potencial de oxirredução; σ : condutividade elétrica; pH: potencial hidrogeniônico.

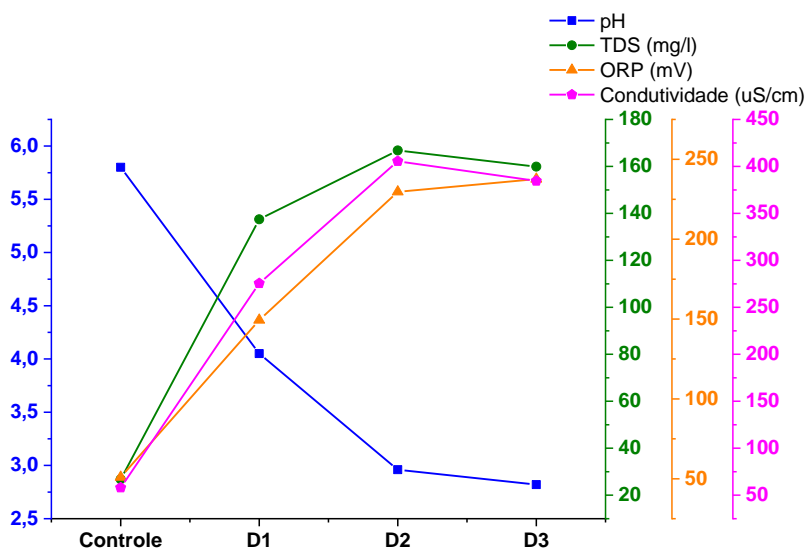
DC: controle destilada não ativada; D1: Água destilada ativada por plasma de argônio; D2: Água destilada ativada por plasma de argônio e ar comprimido; D3: Água destilada ativada por plasma de ar comprimido; SC: controle solução salina 0,9% não ativada; S1: solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio; S2: solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio e ar comprimido; S3: solução salina 0,9% ativada por plasma de ar comprimido.

Fonte: Elaborado pela autora.

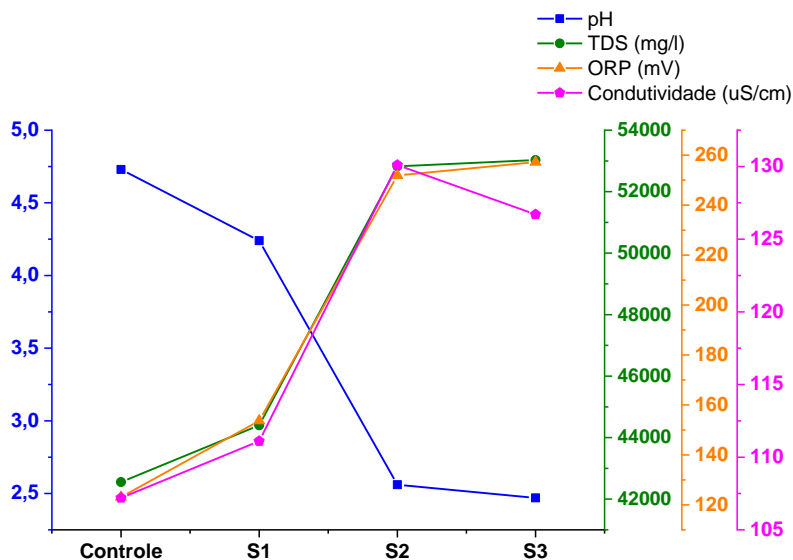
Figura 5: Valores de pH, ORP, TDS e Condutividade dos líquidos ativados com plasma.



(a)



(b)



(c)

Legenda: Gráficos com os valores dos parâmetros físicos mensurados de a) água destilada ativada com diferentes gases na vazão de 1,5 l/min; b) água destilada ativada com diferentes gases na vazão de 3,0 l/min e c) solução salina 0,9% ativada com diferentes gases na vazão de 3,0 l/min; D1: água destilada ativada com Argônio; D2: água destilada ativada com Argônio e ar comprimido; D3: água destilada ativada com ar comprimido; CS: salina controle, não ativada; S1: salina ativada com Argônio; S2: salina ativada com Argônio e ar comprimido; S3: salina ativada com ar comprimido; ORP: Potencial de oxirredução; TDS: Total de sólidos dissolvidos; pH: potencial hidrogeniônico.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Avaliação das espécies reativas formadas durante a ativação dos líquidos por plasma

4.2.1 Análise por espectroscopia

Após realizar a deconvolução das bandas dos espectros de absorvâncias dos LAP, verificou-se através da Figura 6 (a-c) que cada banda representadas pelos círculos pretos, nas diferentes figuras (a, b e c) apesar de serem similares, apresentaram individualidade em suas formas, e isso é influenciado pelas bandas de espécies reativas integradas (bandas coloridas) sob essas curvas principais.

Observou-se que a presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido nitroso (HNO_2), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), e ozônio (O_3), na água destilada (Figura 6 a, b e c) e a solução salina Figura 7 (a, b e c) ativadas por plasma de diferentes gases . A análise de deconvolução é semiquantitativa, porém fornece informações valiosas, sobre as espécies que foram formadas. Na Figura 6 (d) e Figura 7 (d) os gráficos demonstraram as áreas sob a curva das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que foram observadas nos espectros de absorvância da água (Figura 6 (a, b e c) e da solução salina 0,9% (Figura 7 (a, b e c).

Tabela 5 e 6 mostram as áreas sob a curva referente a cada RONS formada durante o processo de ativação dos LAPs, assim como a proporção de cada uma das espécies dentro de cada um dos grupos.

Observou-se que para quase todos os todos os grupos, com exceção apenas do S3, o nitrato(NO_3^-) foi a espécie que foi formada em maior proporção e relação às demais espécies de cada grupo. Apenas no grupo S3 o nitrito (NO_2^-) foi formado em maior quantidade. Para quase todos os grupos, como exceção do grupo S3, a espécie que foi formada em menor proporção foi o ozônio (O_3). Para o S3 a espécie formada em menor proporção foi o ácido nitroso (HNO_2).

Os únicos grupos que seguiram as mesmas proporções entre as espécies formadas foram o D2 e o D3, onde as proporções da menor para a maior foram: nitrato (NO_3^-) > ácido nitroso (HNO_2) > Nitrito (NO_2^-) > Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) > Ozônio (O_3). Para os demais grupos as proporções entre cada espécie formadas divergiram.

De acordo com a literatura, as espécies reativas que mais são descritas como responsáveis pelas ações biológicas são o peróxido de hidrogênio. Os grupos que apresentaram a maior proporção de peróxido de hidrogênio foram D1 e S1, precedida da formação de ácido nitroso (HNO_2). Para os grupos D1, D2 e D3 esse foi o segundo RONS formado em maior proporção (19,2 %, 18,2% e 20,3%), respectivamente, perdendo apenas para o nitrato. Dos grupos de LAP ativado a partir de solução salina, o que apresentou a maior concentração de ácido nitroso foi o S1 (8,7%) quando comparado ao S2 e S3 (3,3% e 3,5% respectivamente).

A equação química abaixo mostra como as espécies reativas mensuradas nesse trabalho, podem influenciar na formação de subprodutos com ação biológica como o peroxinitrito.

Equação 1 – Produção de espécies reativas a partir de plasma de Argônio em meio aquoso

1. **Ativação por Plasma de Argônio:**



2. **Formação de Radicais Hidroxila ($\bullet\text{OH}$) a partir de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2):**



3. **Reação de Óxido Nítrico (NO) com Radicais Hidroxila ($\bullet\text{OH}$):**



4. **Formação de Nitrato (NO_3^-) a partir de Ácido Nítrico (HNO_3):**



5. **Formação de Nitrito (NO_2^-) a partir de Óxido Nítrico (HNO_2):**



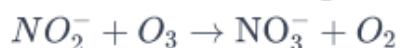
6. **Reação de Nitrito (NO_2^-) com Ozônio (O_3):**



7. **Reação de Nitrato (NO_3^-) com Radicais Hidroxila ($\bullet\text{OH}$):**



8. **Reação de Nitrito (NO_2^-) com Ozônio (O_3):**



9. **Formação de Peróxinitrito (ONOOH) a partir de Ácido Nítrico (HNO_3):**



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5 – Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) formadas a partir de água destilada ativada com os diferentes gases, com as áreas sob e a curva e as proporções de cada espécie reativa formada para cada grupo.

Espécies	D1			D2			D3		
	Área	±	%	Área	±	%	Área	±	%
H₂O₂	11,3	0,7	18,8%	11,1	1,3	9,7%	10,4	3,1	9,4%
HNO₂	11,5	0,8	19,2%	21,6	5,7	18,8%	22,3	19,9	20,3%
NO₃⁻	33,2	0,8	55,2%	54,7	29,8	47,8%	52,9	142,7	48,3%
NO₂⁻	2,9	0,3	4,8%	19,8	6,7	17,3%	16,8	24,3	15,3%
O₃	1,2	0,1	2,0%	7,4	0,3	6,5%	7,3	4,1	6,6%

Total	60,1	2,8	100,0%	114,5	43,9	100,0%	109,7	194,1	100,0%
--------------	------	-----	--------	-------	------	--------	-------	-------	--------

Legenda: D1: Água destilada ativada por plasma de argônio; D2: Água destilada ativada por plasma de argônio e ar comprimido; D3: Água destilada ativada por plasma de ar comprimido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; HNO₃: ácido nítrico; NO₃⁻: nitrato; NO₂⁻: nitrito e O₃: ozônio.

Fonte: Elaborado pela autora.

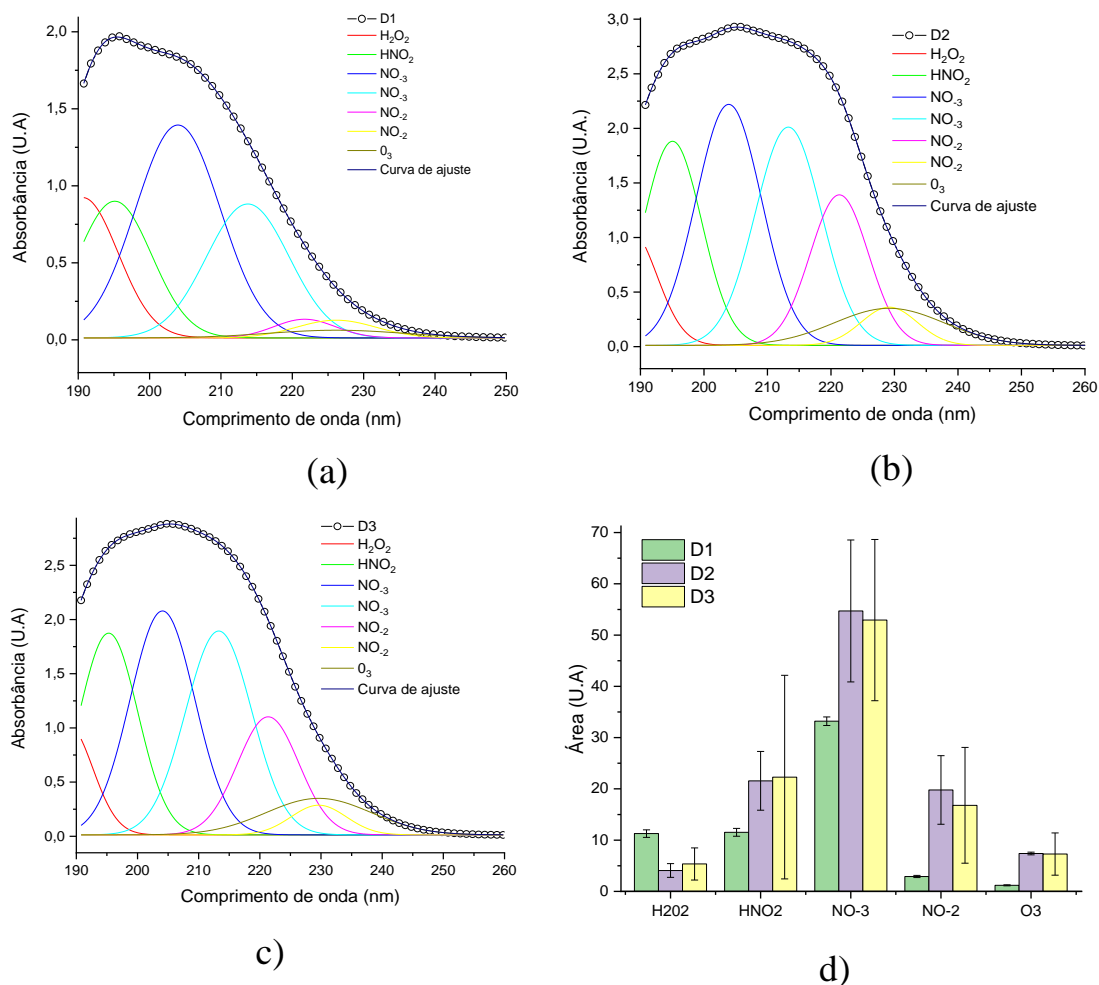
Tabela 6 – Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) formadas a partir de água destilada ativada com os diferentes gases, com as áreas sob e a curva e as proporções de cada espécie reativa formada para cada grupo.

Espécies	S1			S2			S3		
	Área	±	%	Área	±	%	Área	±	%
H₂O₂	0,4	0,2	2,5%						
HNO₂	1,3	0,8	8,4%	2,5	1,3	3%	3,0	1,1	3,5%
NO₃⁻	10,6	0,8	67,3%	41,7	18,4	54%	30,1	17,0	35%
NO₂⁻	3,2	0,3	20,5%	33,0	14,7	43%	49,4	24,7	58%
O₃	0,2	0,1	1,4%	0,2	0,1	0,2%	3,2	0,4	3,7%
Total	15,8	2,3	100,0%	77,4	34,6	100%	85,7	43,3	100%

Legenda: S1: solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio; S2: solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio e ar comprimido; S3: solução salina 0,9% ativada por plasma de ar comprimido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; HNO₃: ácido nítrico; NO₃⁻: nitrato; NO₂⁻: nitrito e O₃: ozônio.

Fonte: Elaborado pela autora.

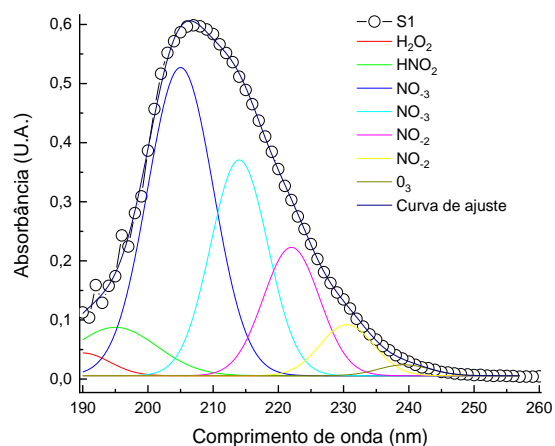
Figura 6 – Espectros de absorvância dos líquidos ativados por plasma (LAP), com as bandas de espécies reativas para a) espécies reativas de LAP do grupo D1; b) espécies reativas de LAP do grupo D2; c) espécies reativas de LAP do grupo D3 e d) gráfico com as áreas sob a curva de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio.



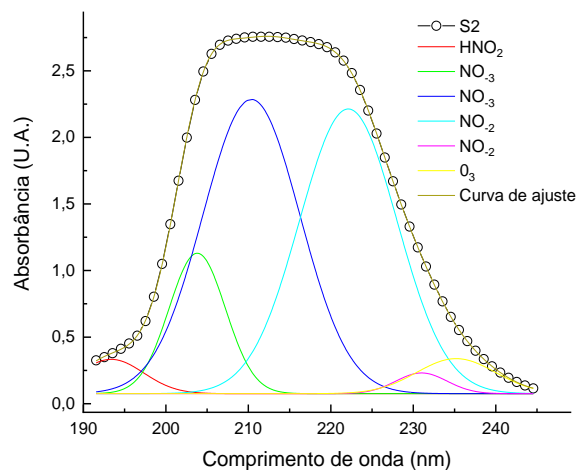
Legenda: D1: Água destilada ativada por plasma de argônio; D2: Água destilada ativada por plasma de argônio e ar comprimido; D3: Água destilada ativada por plasma de ar comprimido; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; HNO_2 : ácido nitroso; NO_3^- : nitrato; NO_2^- : nitrito e O_3 : ozônio.

Fonte: Elaborado pela autora.

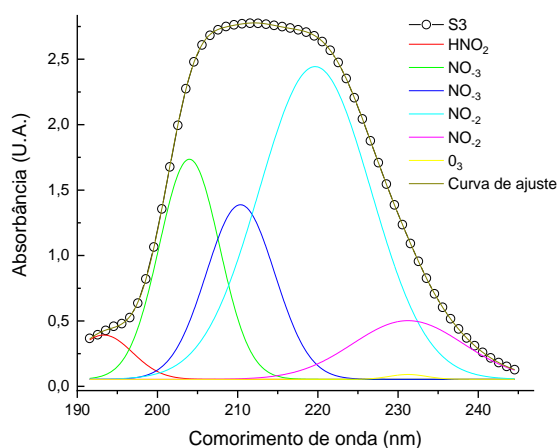
Figura 7 – Espectros de absorvância dos líquidos ativados por plasma (LAP), com as bandas de espécies reativas para a) espécies reativas de LAP do grupo S1; b) espécies reativas de LAP do grupo S2; c) espécies reativas de LAP do grupo S3 e d) gráfico com as áreas sob a curva de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio.



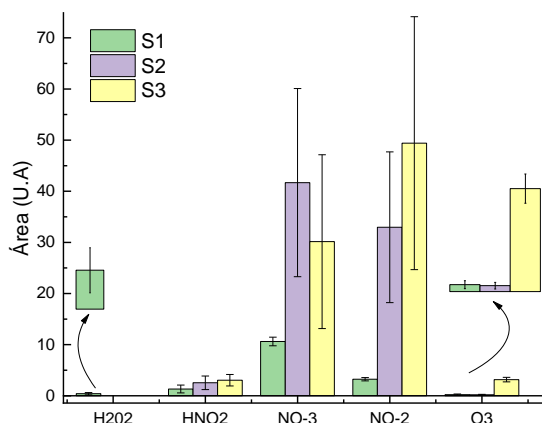
(a)



(b)



(c)



(d)

Legenda: S1: solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio; S2: solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio e ar comprimido; S3: solução salina 0,9% ativada por plasma de ar comprimido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; HNO₂: ácido nitroso; NO₃⁻: nitrato; NO₂⁻: nitrito e O₃: ozônio.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.2 Análise por fitas reativas

Os dados obtidos das concentrações das diferentes espécies reativas geradas pelo plasma de diferentes gases estão apresentados na Tabela 7.

Observou-se que as espécies de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) estavam em uma concentração superior nos grupos ativados apenas com plasma de

Argônio, como é o caso dos grupos D1 onde a concentração foi de 2 mg/L e S1 que foi entre 2 e 5 mg/L. Contudo, estes grupos apresentaram as menores concentrações de nitrito e nitrato quando comparadas aos demais grupos. O inverso foi observado nos grupos de solução salina ativado com plasma de argônio e ar comprimido (S2), salina ativado com plasma de ar comprimido (S3), água destilada ativada com plasma de argônio e ar comprimido (D2) e água destilada ativada com plasma de ar comprimido (D3), onde as concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram menores na faixa de 0,5 mg/L, em contrapartida a geração de nitrito foi entre 250-500 mg/L para os grupos S2 e S3 e de nitrato foi de 80 mg/L. O grupo D2 e D3 apresentaram concentrações na faixa de 250 mg/L de nitrito, e para o nitrato o grupo D2 resultou em uma concentração de 40 mg/L enquanto D3 entre 40-80 mg/L de nitrato. Os LAPs ativados com plasma de ar comprimido apresentaram um maior potencial de geração de espécies reativas de nitrito e nitrato, quando comparadas aos plasmas gerados apenas de argônio.

Tabela 7 – Concentrações (mg/L) das espécies reativas peróxido de hidrogênio, nitrito, nitrato e ozônio nos líquidos ativados avaliados.

Grupos	Ozônio	H₂O₂	Nitrato	Nitrito
D1	0,03 mg/L	2 mg/L	25-50 mg/L	1-5 mg/L
D2	0,86 mg/L	0,5 mg/L	250 mg/L	40 mg/L
D3	1,22 mg/L	0,5 mg/L	250 mg/L	40-80 mg/L
S1	0,02 mg/L	2 – 5 mg/L	10-25 mg/L	1-5 mg/L
S2	0,76 mg/L	0,5 mg/L	250-500 mg/L	80 mg/L
S3	1,76 mg/L	0,5 mg/L	250-500 mg/L	80 mg/L

Legenda: H₂O₂: peróxido de hidrogênio; D1: Água destilada ativada por plasma de argônio; D2: Água destilada ativada por plasma de argônio e ar comprimido; D3: Água destilada ativada por plasma de ar comprimido; S1: solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio; S2: solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio e ar comprimido; S3: solução salina 0,9% ativada por plasma de ar comprimido.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 Determinação da ação inibitória de água destilada ativada por plasma frente células planctônicas de *C. albicans*

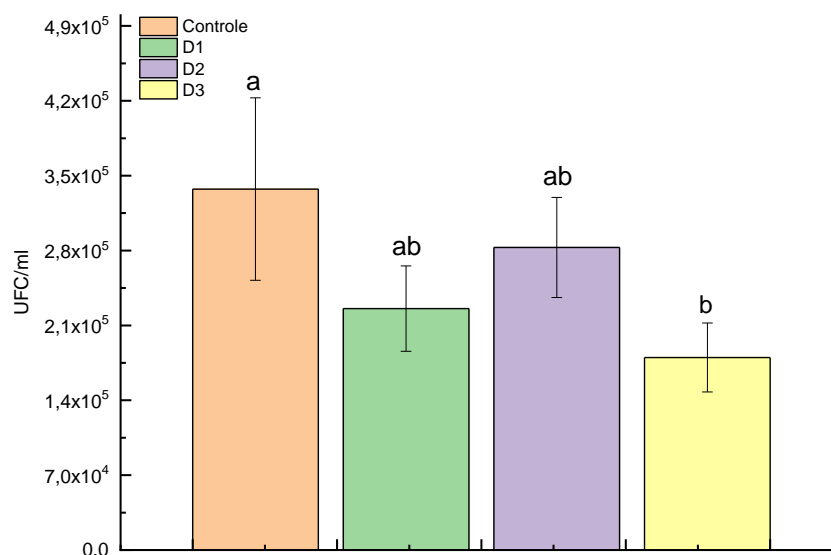
4.3.1 Determinação da ação inibitória de água destilada ativada com plasma com diferentes gases na vazão de 1,5 l/min frente a *C. albicans*

Todos os grupos de LAPs ativados com gases na vazão de 1,5 l/min reduziram as contagens de UFC/mL em relação ao controle, após 30 minutos de contato, como pode ser observado na Figura 8.

O grupo tratado com água destilada ativada com plasma de ar comprimido (D3) apresentou uma redução de 46,66%, e foi o único que apresentou redução significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). O segundo grupo com a maior redução, foi o grupo de água destilada ativada com plasma de argônio (D1), e apesar de ter demonstrado uma redução de 33,12%, essa redução não teve significância estatística. Por último, o grupo de água ativada com plasma da mistura de argônio e ar comprimido (D2) demonstrou um resultado de redução bem menos expressivo de 16,19%, e sem significância estatística.

Contudo, apesar do grupo de água destilada ativada com plasma de ar comprimido (D3) ser estatisticamente diferente do controle, a análise de variância *one way* (ANOVA) ($p < 0,05$), revelou que estatisticamente o grupo D3 é igual aos grupos de água destilada ativada com plasma de argônio (D1) e de água ativada com plasma da mistura de argônio e ar comprimido (D2), como mostra a Figura 8.

Figura 8 – Valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) de *Candida albicans* após exposição, por 30 minutos, à água destilada ativada com plasma formado a partir de diferentes fontes de gases a uma vazão de 1,5 l/min



Legenda: Gráficos com comparação entre grupo controle e plasma, as diferentes letras indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$); D1: Água destilada ativada por plasma de argônio; D2: Água destilada ativada por plasma de argônio e ar comprimido e D3: Água destilada ativada por plasma de ar comprimido.

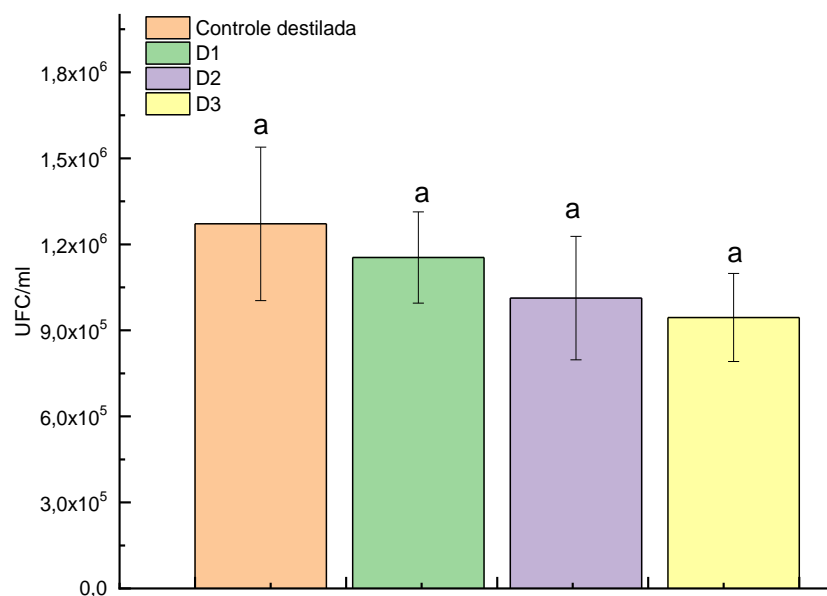
Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.2 Determinação da ação inibitória da água destilada após 1 dia de ativação com plasma com diferentes gases na vazão de 3,0 l/min frente a *C. albicans* com 10 minutos de exposição.

Após contato por 10 minutos com água destilada ativada com plasma de argônio (D1), de água destilada ativada pelo plasma da mistura dos gases argônio e ar comprimido (D2) e do grupo de água destilada ativada com plasma de ar comprimido (D3), não foi observada redução significativa de UFC/mL após 10 minutos de exposição ($p < 0,05$) nos grupos de LAPs em relação ao grupo controle,

como pode-se observar na Figura 9.

Figura 9 - Valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de *Candida albicans* após exposição por 10 minutos em água destilada ativada com plasma formado a partir diferentes fontes de gases a uma vazão de 3,0 L/min.



Legenda: Gráficos com comparação entre grupo controle e plasma, as letras iguais indicam que não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$); D1: Água destilada ativada por plasma de argônio; D2: Água destilada ativada por plasma de argônio e ar comprimido e D3: Água destilada ativada por plasma de ar comprimido.

Fonte: Elaborado pela autora.

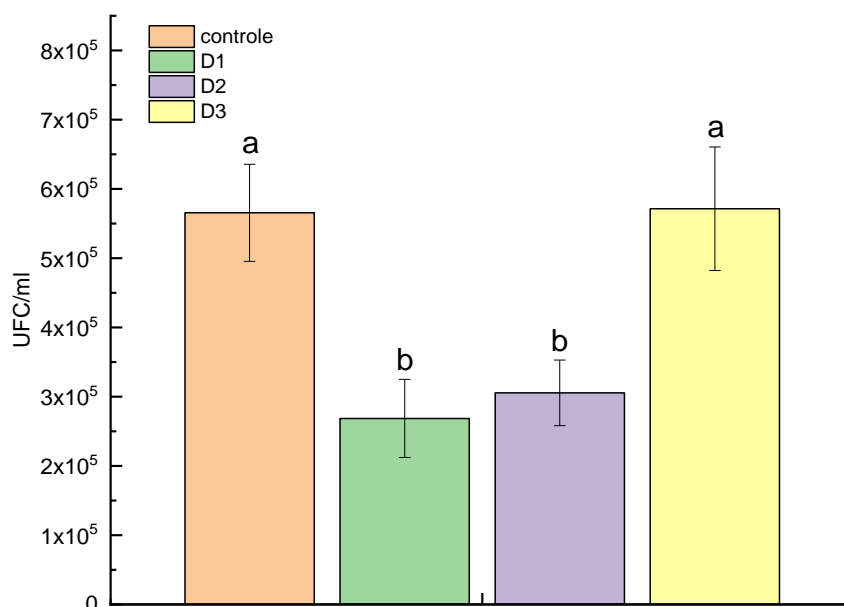
4.3.3 Determinação da ação inibitória da água destilada após 1 dia de ativação com plasma com diferentes gases na vazão de 3,0 l/min frente a *C. albicans* com 30 minutos de exposição

Após a ação dos LAPs ativados por plasmas de gases na vazão de 3,0l/min, observou-se que apenas dois grupos reduziram em relação ao grupo controle quando colocados em contato com células planctônicas de *C. albicans* por 30

minutos. Esses grupos foram o de água destilada ativada com plasma de argônio (D1), com uma redução de na contagem de colônias de 53%, e o de água destilada ativada pelo plasma da mistura dos gases argônio e ar comprimido (D2), que teve uma redução menos expressiva que o grupo D1, de 46%, todavia estatisticamente D1 e D2 são iguais ($p < 0,05$). Os grupos D1 e D2 apresentaram significância estatística em relação ao grupo controle, e em relação ao grupo de água destilada ativada com plasma de ar comprimido (D3), como foi possível visualizar na Figura 10.

Não houve redução significativa para o grupo de água destilada ativada com plasma de ar comprimido (D3) em relação ao grupo controle.

Figura 10 - Valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) de *Candida albicans* após exposição por 30 minutos à água destilada ativada com plasma produzidos a partir de diferentes gases a uma vazão de 3,0 l/min.

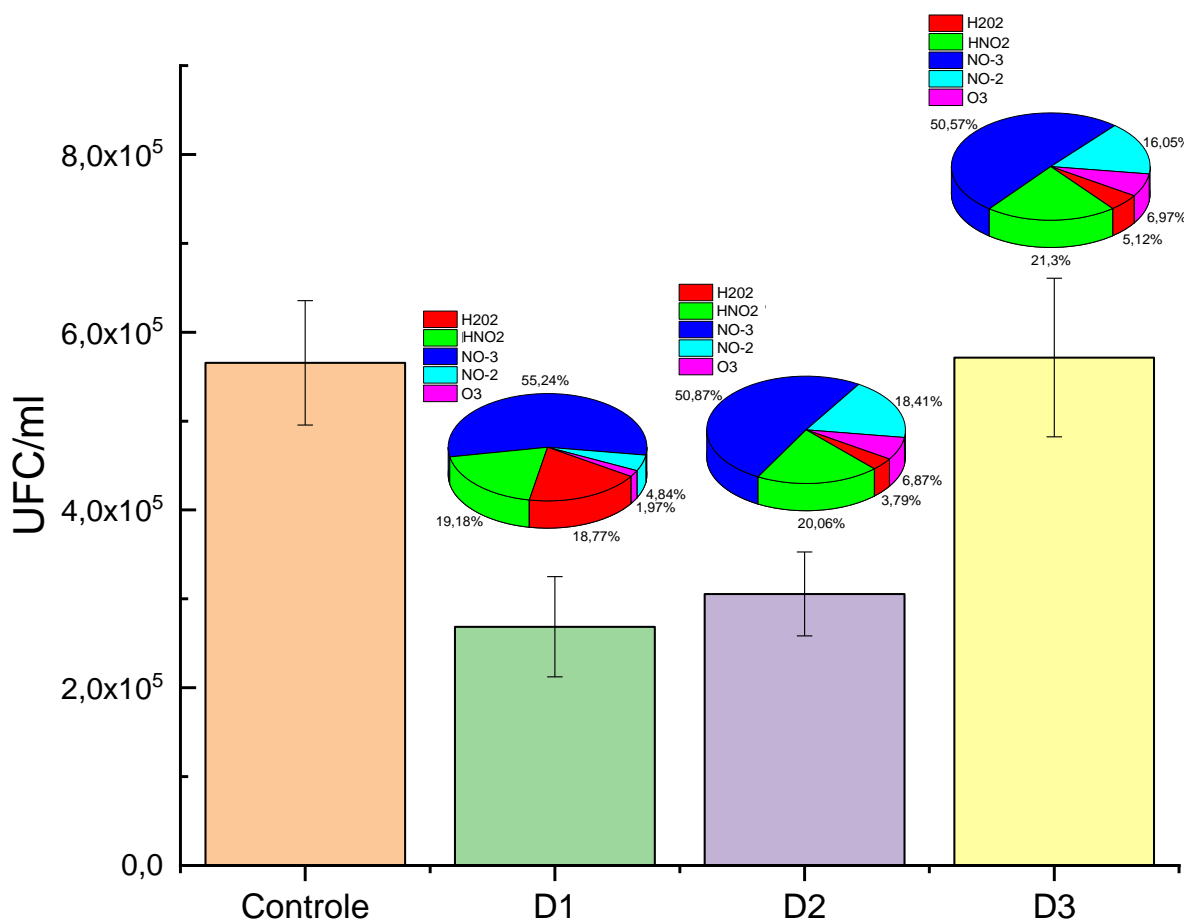


Legenda: Gráficos com comparação entre grupo controle e plasma, as diferentes letras indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$); D1: Água destilada ativada por plasma de argônio; D2: Água destilada ativada por plasma de argônio e ar comprimido e D3: Água destilada ativada por plasma de ar comprimido.

Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 11 demonstra a relação entre atividade antifúngica em relação as espécies reativas formadas. Pode-se observar que para o grupo de água destilada ativada com plasma de argônio que apresentou a maior redução na contagem de colônias, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado em uma maior proporção em relação aos demais grupos, e o ozônio (O_3), no grupo D1 é formado em menor concentração quando comparado aos demais grupos.

Figura 11: Gráfico representativo da redução antifúngica de células planctônicas de *C. albicans* em comparação as espécies reativas formadas em cada um dos diferentes grupos



Legenda: Gráficos com comparação entre grupo controle e de líquidos ativados com plasma e as respectivas espécies reativas formadas em cada grupo; D1: Água destilada ativada por plasma de argônio; D2: Água destilada ativada por plasma de argônio e ar comprimido e D3: Água destilada ativada por plasma de ar comprimido; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; HNO_2 : ácido nitroso; NO_3^- : nitrato; NO_2^- : nitrito e O_3 : ozônio.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Determinação da ação inibitória de solução salina 0,9% ativada por plasma frente células planctônicas de *C. albicans*

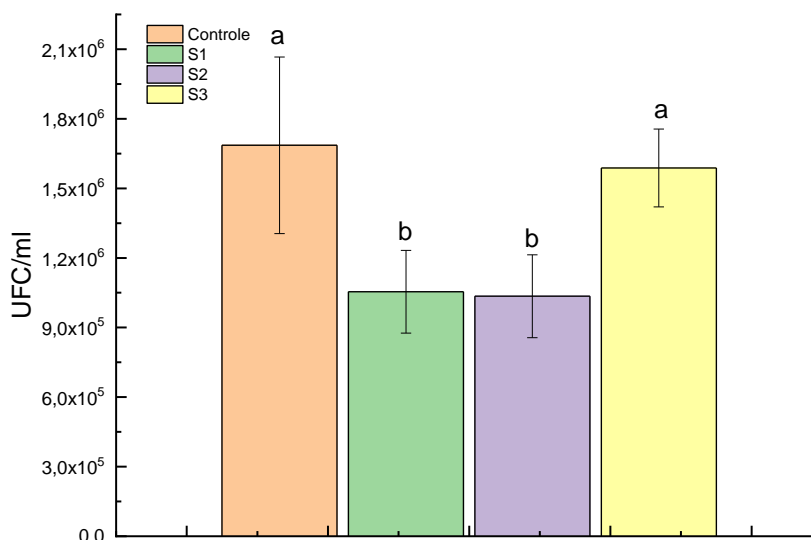
4.4.1 Determinação da ação inibitória da solução salina 0,9% após 1 dia de ativação com plasma formado a partir de diferentes gases na vazão de 3,0 l/min frente a *C. albicans* com 10 minutos de exposição

Observou-se que houve redução na contagem de colônias dos grupos de solução salina ativada com plasma de argônio (S1) de 37,45% e para o grupo de solução salina ativada com plasma da mistura de argônio e ar comprimido (S2) de 38,6%.

As reduções observadas nos grupos S1 e S2 foram significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como pode-se observar na Figura 12, porém, estatisticamente os grupos S1 e S2 foram iguais.

O grupo de solução salina 0,9% ativado com plasma de ar comprimido (S3) reduziu apenas 9,95 %, e esta redução não foi significativa em relação ao grupo controle. As contagens de UFC/ml de S3 foram significativamente mais elevadas em relação a S1 e S2.

Figura 12 - Valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) de *Candida albicans* após exposição por 10 minutos a solução salina 0,9% ativada com plasma gerado a partir de diferentes fontes de gases a uma vazão de 3,0 l/min.



Legenda: Gráficos com comparação entre grupo controle e plasma, as diferentes letras indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$); S1: solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio; S2: solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio e ar comprimido e S3: solução salina 0,9% ativada por plasma de ar comprimido.

Fonte: Elaborado pela autora.

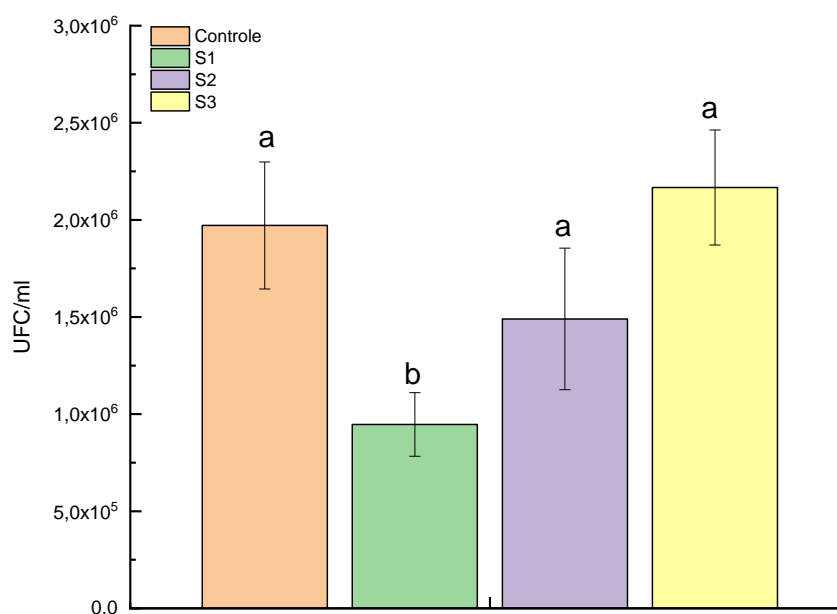
4.4.2 Determinação da ação inibitória da solução salina 0,9% após 1 dia de ativação com plasma com diferentes gases na vazão de 3,0 l/min frente a *C. albicans* com 30 minutos de exposição

Após a exposição das células platônicas de *C. albicans* aos LAPs por 30 minutos, pode-se observar que houve redução na contagem de colônias para os grupos de solução salina ativada com plasma de argônio (S1) de 52% e para o grupo de solução salina ativada com plasma de mistura de argônio e ar comprimido (S2) de 46%. Todavia, apenas o grupo S1 teve significância em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como demonstrado na Figura 13.

O grupo exposto à solução salina ativada com plasma de ar comprimido (S3) não apresentou redução significativa na contagem de colônias em relação ao grupo controle. Não foi observada diferença significativa entre os grupos de

solução salina ativada com plasma de mistura de argônio e ar comprimido (S2), solução salina ativada com ar comprimido (S3) e o grupo controle.

Figura 13- Valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) de *Candida albicans* após exposição por 30 minutos à solução salina 0,9% ativada com plasma gerado a partir de diferentes fontes de gases a uma vazão de 3,0 l/min.



Legenda: Gráficos com comparação entre grupo controle e plasma, as diferentes letras indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$); S1: solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio; S2: solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio e ar comprimido e S3: solução salina 0,9% ativada por plasma de ar comprimido.

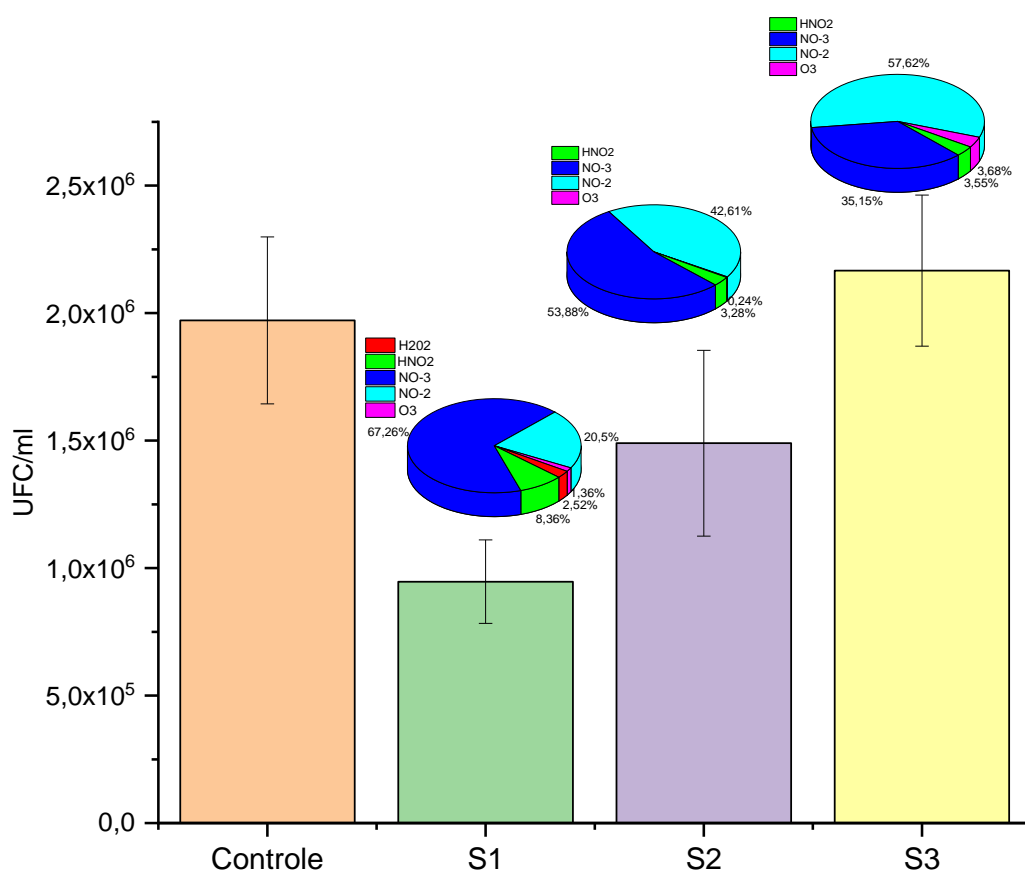
Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 14 ilustra a atividade antifúngica exercida pelos LAPs produzidos a partir de solução salina NaCl 0,9% e ativados por plasmas de diferentes gases e as espécies reativas formadas em cada um dos grupos.

Observou-se que o único grupo onde foi detectado a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi no grupo de solução salina ativada pelo plasma de argônio, e este foi o grupo com a melhor redução antifúngica. O grupo de solução

salina ativada por ar comprimido (S3), por outro lado, foi o grupo que apresentou a maior concentração de ozônio em relação aos demais grupos. Para os grupos ativados por plasma de argônio (S1) e ativado pelo plasma da mistura de argônio e ar comprimido, o componente em maior percentual foi o nitrato, precedido pelo nitrito. Porém, apenas para o grupo que não mostrou atividade antifúngica, que foi o ativado com plasma de ar comprimido (S3) observou-se uma inversão na proporção do nitrito que foi a espécie em maior proporção precedida pelo nitrato, resultado inverso dos grupos (S1 e S2).

Figura 14: Gráfico representativo da redução antifúngica de células planctônicas de *C. albicans* em comparação as espécies reativas formadas em cada um dos diferentes grupos de líquidos ativados.



Legenda: Gráficos com comparação entre grupo controle e de líquidos ativados com plasma e as respectivas espécies reativas formadas em cada grupo; S1: Solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio; S2: Solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio e ar comprimido e S3: Solução salina 0,9% ativada por plasma de ar comprimido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; HNO₂: ácido nitroso; NO₃⁻: nitrato; NO₂⁻: nitrito e O₃: ozônio.

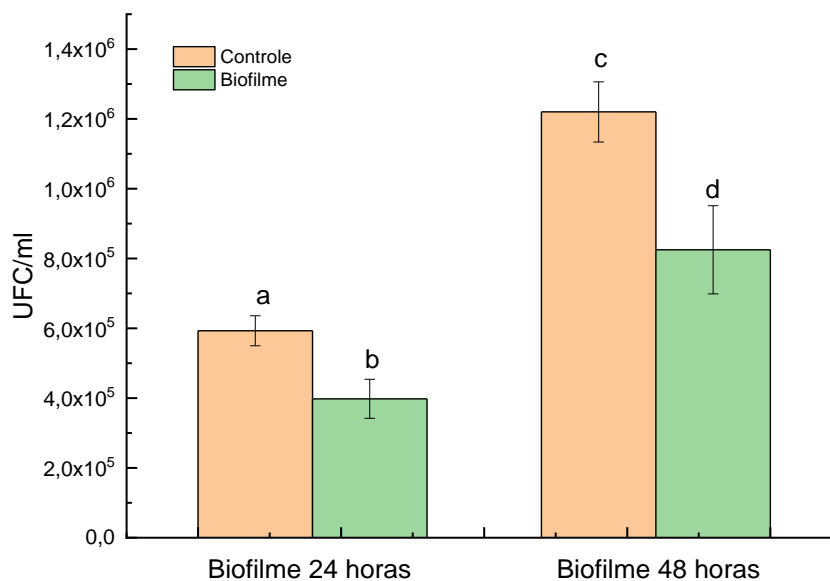
Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Determinação da ação inibitória dos líquidos ativados por plasma frente biofilmes de *C. albicans* com 30 minutos de tratamento

4.5.1 Determinação ação sobre biofilmes de 24 e 48 da água destilada ativada com plasma de argônio

Observou-se uma redução significativa na viabilidade de biofilmes de 24 horas expostos à água destilada ativada com argônio de 32,86% em relação ao grupo controle. Resultado semelhante foi observado para os biofilmes de 48 horas, onde houve redução significativa de 32,37% em relação ao controle.

Figura 15 - Gráfico de comparação da ação antibiofilme da água destilada ativada com plasma Argônio em uma vazão de 3,0 l/min sobre biofilmes de *Candida albicans* de 24 horas e 48 horas.



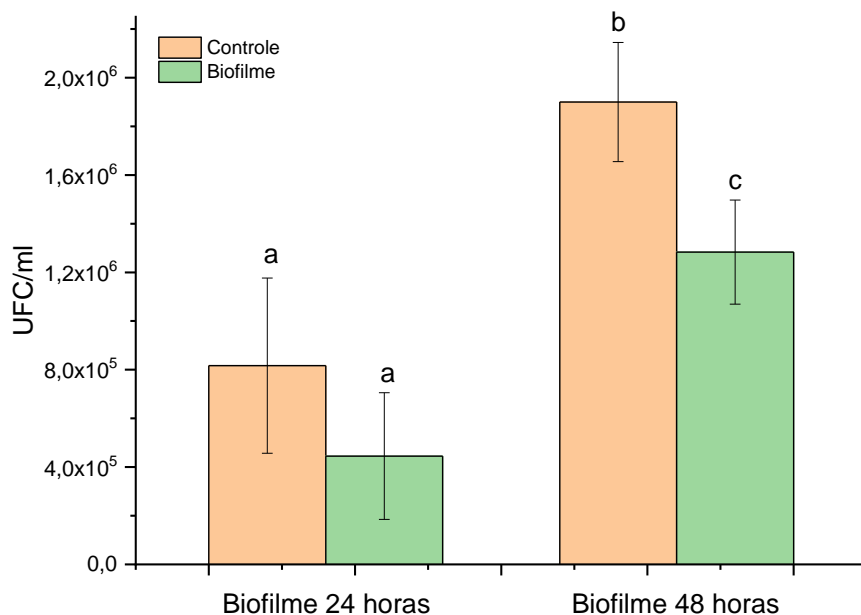
Legenda: Gráficos com comparação entre grupo controle e plasma, as diferentes letras indicam diferença estatística significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.1 Determinação ação sobre biofilmes de 24 e 48 da solução salina 0,9% ativada com plasma de argônio

Para os biofilmes de 24 e 48 horas tratados com solução salina ativada por plasma de argônio, observou-se que o biofilme de 24 horas, apesar de haver uma redução de 45,10% no número de células viáveis, a redução não foi significativa em relação ao controle ($p > 0,05$). Todavia, para o biofilme de 48 horas observou-se uma redução significativa em relação ao controle (32,45%).

Figura 16 - Comparação da ação antibiofilme da solução salina 0,9% ativada com Argônio em uma vazão de 3,0 l/min em biofilmes de 24 horas e 48 horas.



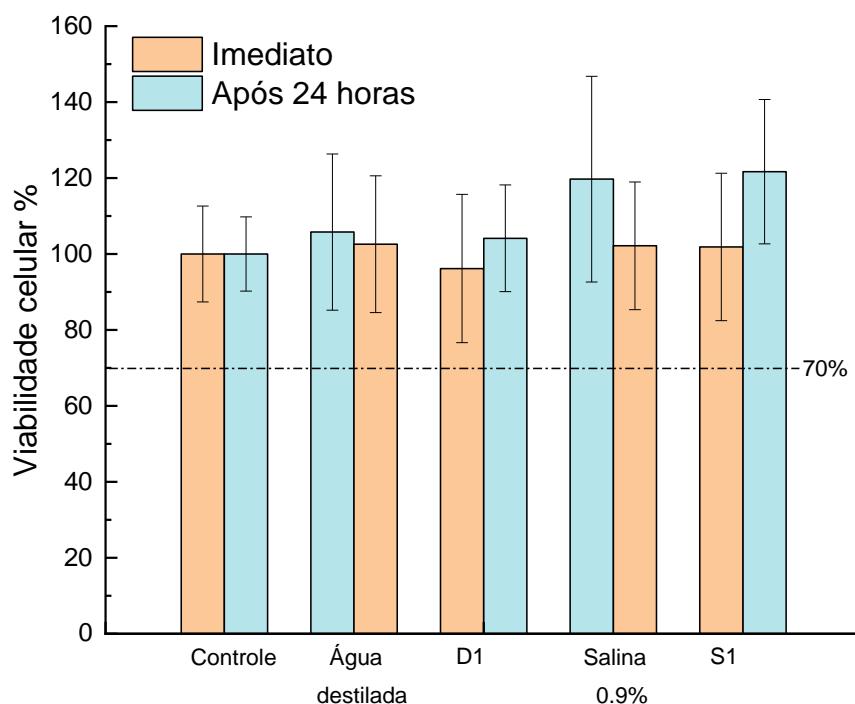
Legenda: Gráficos com comparação entre grupo controle e plasma, as diferentes letras indicam diferença estatística significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.6 Avaliação de citotoxicidade imediata e citotoxicidade após 24 horas dos líquidos ativados com plasma

Observou-se que todos os líquidos ativados com plasma, tanto derivados da solução salina quanto da água destilada promoveram viabilidade celular superior a 70% após contato com células Vero por 30 minutos. A baixa toxicidade foi observada tanto para o contato imediato quanto após 24 horas, como mostra a Figura 17.

Figura 17 – Viabilidade celular em relação ao controle de crescimento observada após exposição de células Vero aos líquidos ativados, imediatamente e após 24 horas.



Legenda: Gráficos com comparação entre grupo controle (meio de cultura), água destilada e solução salina 0,9% sem tratamentos (controles negativos) e dos líquidos ativados com plasma D1: líquido ativado com plasma de argônio e S1: Solução salina 0,9% ativada por plasma de argônio, a linha tracejada representa o mínimo de viabilidade celular permitido pela ISO 10993-5:2009, abaixo de 70% é considerado citotóxico.

Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

Diversos estudos demonstraram que diferentes variáveis afetam a composição dos líquidos ativados com plasma, como o tempo de ativação dos líquidos, a vazão de gás assim como a composição do gás.

A partir da avaliação dos parâmetros físico-químicos mensurados, observou-se que ao utilizar uma vazão menor de gases (1,5 l/min), os parâmetros físico-químicos após a ativação dos líquidos se modificaram, porém não em níveis tão expressivos quando comparados à ativação com os gases na vazão de 3,0 l/min. A alteração dos parâmetros físico-químicos é um indicativo de que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) foram formadas.

A análise da condutividade elétrica é um parâmetro utilizado para verificar a concentração de íons reativos na água (Guo et al., 2021; Hu et al., 2023; Thirumdas et al., 2018; Xia et al., 2023). Em nossos achados, observou-se que após a ativação da água destilada pelos plasmas de diferentes gases, ocorreu o aumento da condutividade.

Ao aumentar a vazão de todos os gases para 3,0 l/min, o aumento da condutividade foi ainda mais expressivo, e também foram confirmadas as presenças de RONS de vida longa como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), e ozônio (O_3). Esses dados corroboram os estudos de Lamichhane et al., 2022; Xia et al., 2023, que após a ativação da água por plasma de argônio, relataram um aumento significativo na condutividade elétrica, que é proporcional ao aumento de espécies. De fato, observou-se que os grupos D2, D3, S2 e S3 que apresentaram as maiores condutividades quando comparados aos grupos D1 e S1 tiveram as maiores concentrações de espécies reativas de nitrato, nitrito e ozônio.

Outro parâmetro mensurado e que está relacionado com a formação de espécies reativas é o potencial de oxirredução (ORP), que indica a capacidade da

solução em oxidar ou reduzir outra substância. Também é considerada uma avaliação rápida sobre o potencial de desinfecção de uma solução (Thirumdas et al., 2018). O aumento observado de ORP tanto nos grupos com vazão de 1,5 l/min quanto nos demais grupos de LAP gerados com diferentes gases na vazão de 3,0 l/min, foi semelhante aos trabalhos de Xia et al., 2023; Y. Xu et al., 2016. que após a ativação dos líquidos, observaram aumentos significativos nos valores de ORP. Thirumdas et al., 2018 e Ma et al., ano afirmaram que quanto maior os valores de ORP, mais forte será a capacidade oxidante, aumentando o potencial antimicrobiano.

Alguns autores (Bai et al., 2020; Chiappim et al., 2021; Ma et al., 2016; Sampaio et al., 2022) relacionaram que quanto maior os valores de ORP e menores os valores de pH, maiores serão as concentrações espécies reativas nos LAPs. O ambiente ácido favorece a formação e manutenção de algumas espécies (Girard et al., 2016; Laurita et al., 2015; Liu et al., 2020a; Tsoukou et al., 2020; Zhou et al., 2018). Estas observações foram detectadas nos grupos D2, D3, S2 e S3, onde os valores de pH diminuíram em 49,0%, 51,3%, 45,8% e 47,8%, respectivamente. Esses mesmos grupos apresentaram os maiores valores de ORP, com um aumento de 70,4% para D2, 76,6% para D3, 51,1% para S2 e de 52,1% para S3.

Outro parâmetro que, após a ativação dos LAPs, aumentou em todos os grupos foi o TDS, comprovando que novas espécies químicas foram geradas, uma vez que a concentração de sólidos dissolvidos na água aumentou. Os estudos de Miranda et al., 2023a; Sampaio et al., 2022 observaram um comportamento semelhante após a ativação de líquidos, com um aumento do TDS. O TDS foi mais um parâmetro mensurado, que comprovou a presença e maior concentração de RONS. Assim como para ORP e condutividade, os grupos D2, D3, S2 e S3 mostraram os valores mais elevados de TDS em relação aos grupos controle (CD e CS), S1 e D1.

Os parâmetros físico-químicos são ferramentas importantes em um *screening* inicial como indicativos da formação de RONS, uma vez que se observou que quanto maior os valores de condutividade, TDS, e ORP inversamente proporcional ao ORP for o pH, maiores serão as concentrações de RONS formadas. E o contrário também pode ser observado nos grupos D1 e S1 que apresentaram valores de condutividade elétrica, TDS e ORP inferiores e pH maior, em relação aos grupos D2, D3, S2 e S3, sendo os grupos que apresentaram as menores concentrações de RONS.

Além da literatura sobre ação de LAPs sobre *C. albicans* ser escassa, os poucos trabalhos que investigaram as ações dos LAPs sobre *C. albicans* não obtiveram respostas significativas na inativação fúngica (Chiappim et al., 2021; Miranda et al., 2023b). A menor efetividade dos LAPs sobre os fungos em relação às bactérias pode estar relacionado com a composição celular mais complexa, contendo uma parede celular de natureza polissacarídica, responsável por regular o estresse osmótico (Fan et al., 2022; Hasim, Coleman, 2019), além de mecanismos de regulação ao estresse envolvendo enzimas específicas, como por exemplo, a superóxido dismutase (SOD) que regula o estresse oxidativo nas células de *C. albicans* (Fan et al., 2022; Serrano-Fujarte et al., 2016). Essas enzimas também estão presentes em células de mamíferos regulando o processo de homeostase. Outra enzima importante no controle das RONS é a catalase, que neutraliza a ação do peróxido e hidrogênio (Serrano-Fujarte et al., 2016). A ausência de reposta antifúngica também pode estar relacionada com as espécies reativas (RONS) formadas, assim como do tipo de micro-organismo e do fenótipo (Tsoukou et al., 2021).

Os únicos estudos relatados até o presente momento que apresentaram atividade antifúngica frente a *C. albicans*, foram relatados por Ercan et al., 2013; e Laurita et al., 2015. Entretanto, o modelo experimental proposto por esses autores, foi partir de suspensões fúngicas diluídas em líquidos que posteriormente

foram ativados em contato direto com a fonte de plasma, diferindo do modelo utilizado neste estudo. Com o protocolo utilizado por estes autores, pode haver maior presença de espécies altamente reativas de vida curta, que têm um papel inicial fundamental na redução da carga microbiana, garantindo a ação antifúngica. No entanto, a translação dos resultados para a prática clínica é dificultada.

O presente estudo observou um importante e promissor resultado no campo de terapias adjuvantes no combate ao patógeno *C. albicans*, uma vez que foi possível encontrar parâmetros antifúngicos efetivos de líquidos ativados com plasma após a sua ativação. No entanto, os tempos de exposição de 10 e 30 minutos ainda são limitantes para a utilização clínica direta. Estudos futuros para a redução do período de exposição são necessários, sejam por adaptações nos protocolos de ativação dos líquidos, sejam por sistemas de entrega de liberação lenta que possibilitem o contato prolongado dos líquidos com os biofilmes fúngicos.

Observou-se que ao utilizar uma vazão menor de gases (1,5 l/min) a redução de *C. albicans* foi significativa apenas para o grupo de água destilada ativada com plasma de ar comprimido (D3), em relação ao grupo controle não ativado (CD) apenas. Esse resultado é ainda um tanto contraditório, uma vez que este grupo estatisticamente foi igual aos grupos de água destilada ativada com plasma de argônio (D1) e ao de água destilada ativada com plasma de argônio + ar comprimido (D2), que foram iguais ao controle (CD). Todavia, apesar dos grupos de gases ativados (D1 e D2) não ter apresentado uma ação biológica antifúngica efetiva frente a *C. albicans*, sabe-se que espécies reativas foram formadas, a partir da análise da dos parâmetros físico-químicos e isso corrobora, com os resultados obtidos em estudos anteriores (Guo et al., 2021; Hu et al., 2023; Thirumdas et al., 2018; Xia et al., 2023). que observaram a formação de RONS após aumento de condutividade.

Ao mudar a vazão dos gases de 1,5 l/min para a vazão de 3,0 l/min houve uma influência significativa na ação antifúngica dos LAPs sobre as células de *C. albicans*. Na vazão menor provavelmente não houve uma boa concentração e/ou distribuição de RONS para gerar resposta antifúngica efetiva, uma vez que ao aumentar a vazão para 3,0 l/min observou-se redução fúngica significativa para os mesmos gases. Observou-se que além da vazão o tipo do gás teve influência sobre o tipo de espécies formadas e isso influenciou diretamente na ação biológica.

Os grupos de LAPs gerados a partir do plasma de Argônio seja ele isolado (S1 e D1 em contato por 30 minutos) (S1 e S2 em contato por 10 minutos), ou misturado com ar comprimido (D2 contato por 30 minutos) mostraram os melhores resultados antimicrobianos, isso provavelmente está associado ao fato da maior formação de espécies de peróxido de hidrogênio nesses grupos.

Vlad et al., 2019 demonstrou em seus estudos um resultado semelhante, onde ao ativar LAPs com plasma de Argônio por 30 minutos, observou-se concentração maior de peróxido de hidrogênio quando comparado aos grupos de LAP ativados com os plasmas de Hélio e ar comprimido. Todavia, os grupos D1 e D2 em contato com *C. albicans* por 10 minutos, não apresentaram ação antifúngica, o que pode estar relacionado à concentração insuficiente das espécies que iniciam o processo de danos às células. Ao prolongar o tempo de ação, ainda que algumas espécies estejam em menor concentração, as colisões moleculares e a sinergia entre as espécies possibilitam que as reações ocorram.

Xia et al., 2023 também evidenciou que os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) eram muito superiores quando os líquidos eram ativados com plasma Argônio quando comparados a ativação apenas por plasma de ar comprimido, como pode ser mensurado tanto pelas fitas reativas, quanto observado na análise espectrofotométrica, onde não se quer observou-se a presença das bandas de peróxido de hidrogênio, nos grupos de solução salina tratada com plasma de argônio e ar comprimido (S2), assim como no grupo de

solução salina tratada com plasma de ar comprimido (S3). Apesar da técnica espectrofotométrica ter um caráter qualitativo, pode ser utilizada como técnica semiquantitativa, sendo uma ferramenta valiosa num *screening* inicial, uma vez que possibilitou identificar as espécies formadas e a proporção em que cada uma foi formada.

Diferentes estudos mostraram que o peróxido de hidrogênio é um dos componentes principais na ação antimicrobiana do plasma (Liu et al., 2020b; Traylor et al., 2011; Tsoukou et al., 2021; Vlad et al., 2019), principalmente porque a partir da reação de peróxido de hidrogênio com nitrito, tem-se como produto nitrato e peroxinitrito (Laurita et al., 2015; Tsoukou et al., 2021; Vlad et al., 2019). Adicionalmente, a partir da reação de peróxido de hidrogênio e ácido nítrico, também se origina o peroxinitrito (Laurita et al., 2015; Liu et al., 2020b). O peroxinitrito vem sendo descrito como um dos principais subprodutos gerados pelo LAPs com ação antimicrobiana (Laurita et al., 2015; Traylor et al., 2011; Vlad et al., 2019; Zhou et al., 2018), inclusive em pequenas concentrações (Zhou et al., 2018). A sua atividade antimicrobiana está associada a capacidade de oxidar, nitrar e hidroxilar biomoléculas em condições fisiológicas, tornando-o citotóxico (Szabó et al., 2007; Zhou et al., 2018). Além disso, é capaz de atravessar facilmente as barreiras biológicas, uma vez que o coeficiente de permeabilidade do peroxinitrito é semelhante ao do peróxido de hidrogênio, isso o torna um oxidante extremamente eficaz em causar danos às células. A capacidade de cruzar rapidamente a bicamada lipídica da membrana celular e iniciaria então a peroxidação e a nitração lipídica e proteica, diretamente ou por sua decomposição em oxidantes de um elétron como $\bullet\text{OH}$ e NO_2 . As reações dessas partículas ($\bullet\text{OH}$ e NO_2) e da membrana celular contribuem para o aumento da permeabilidade através da formação de poros transitórios na membrana em favor de mais RONS penetrando na célula. O peroxinitrito pode ainda, acumular-se no interior resultando em um aumento de RONS intracelular (Szabó et al.,

2007; Zhou et al., 2018).

Os estudos de (Bauer, 2019; Liu et al., 2020a; Zhou et al., 2018) demonstram que quanto maiores as concentrações de peróxido de hidrogênio maiores serão as concentrações de peroxinitrito, o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) gerado da decomposição do peróxido de hidrogênio influenciará em uma maior formação de peroxinitrito. Por tanto, acredita-se que a ação do peróxido de hidrogênio associada à formação de peroxinitrito tenham conferido aos grupos S1 e D1 os melhores resultados microbiológicos.

Xia et al., 2023 observou maiores concentrações de nitrito e nitrato na água ativada com plasma de ar comprimido. Resultados similares foram detectados nesse estudo para os grupos de água destilada ativada com plasma de argônio e ar comprimido (D2), de solução salina 0,9% ativada com plasma de argônio e ar comprimido (S2), de água destilada ativada com plasma de ar comprimido (D3) e de salina 0,9% ativada com plasma de ar comprimido (S3) devido à presença de nitrogênio e oxigênio presente na composição do ar comprimido.

Observou-se que os LAPs gerados a partir apenas do plasma de ar comprimido, como o S3 e D3 não apresentaram efeito inibitório para *C. albicans*, ainda que tenha sido observado as alterações físico-químicas e maior concentração tanto de nitrito quanto de nitrato em relação aos demais grupos.

Outra espécie reativa formada em maior concentração que pode ser observada foi o Ozônio (O_3) para os grupos D3 e S3. Esses resultados correspondem aos achados de Laurita et al., 2015, que descreveu que quanto maiores os níveis de nitrato (NO_3^-), menores serão os níveis de nitrito (NO_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O nitrito (NO_2^-) também reage com o ozônio (O_3) dissolvido e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) levando a formação de nitrato (NO_3^-). Por isso o nitrato (NO_3^-) é mais estável do que o nitrito (NO_2^-), pois o nitrito se decompõe em nitrato (Xia et al., 2023). O nitrito e nitrato de acordo com Girard

et al., 2016 são espécies reativas pobres, porém eles geram intermediário em soluções como é o caso do peroxinitrito, que tem sua formação favorecida em meio ácido a partir das reações entre peróxido de hidrogênio e nitrito (Ma et al., 2020).

Os resultados gerados nesse trabalho mostraram como a química dos LAPs é complexa. O fato de alguns componentes estarem em maior concentração, não garantem a ação antifúngica como foi o caso dos grupos D2, S2 e S3 (em contato por 30 minutos) e D3 e S3 (em contato por 10 minutos). Os componentes produzidos podem reagir entre si gerando subprodutos que não irão promover a ação antimicrobiana, como mostrou M. Ma et al., 2020. Em seu estudo, nitrito, nitrato e peróxido de hidrogênio em meio ácido não possuíram ação bactericida eficiente sob *Escherichia coli*. A ação antibacteriana ocorreu da sinergia do pH baixo com as espécies geradas pelo plasma, associados ao peróxido de nitrogênio e nitrito.

Ainda que alguns grupos de LAPs não tenham demonstrado ação efetiva sobre *C. albicans*, um estudo interessante de se destacar, foi desenvolvido por (Liu et al., 2021), que ao utilizar o LAP em leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* não observaram inibição fúngica. Adicionalmente, não obtiveram redução fúngica utilizando o lauril sulfato de sódio. Após tratar as células fúngicas com LAP e em seguida adicionarem lauril sulfato de sódio, observaram uma redução de 4 logs, o que indicou que o LAP aumentou a permeabilidade celular para a que a outra substância, que anteriormente era inócua, pudesse atuar como um agente antifúngico. Portanto, um fator a ser estudado futuramente também pode ser a contribuição dos LAPs no aumento da permeabilidade celular atuando sinergicamente com agentes antifúngicos convencionais, com isso a concentração dos fármacos pode ser reduzida e isso auxiliar na redução da toxicidade.

Observou-se que as propriedades antifúngicas dos LAPs foram preservadas após o congelamento por 1 dia após o preparo dos LAPs, isso

corroborar com os trabalhos de (Figueira et al., 2018; Traylor et al., 2011; Vlad et al., 2019) que observaram ação antibacteriana de até 7 dias após o armazenamento, e segundo Thirumdas et al., 2018; Tsoukou et al., 2020a ação antibacteriana foi observada após 30 dias de armazenamento do LAPs armazenados em -80°C.

Figueira et al., 2018. observou que em temperaturas mais baixas em torno de 3°C preservaram melhor parâmetros físico-químicos como pH e condutividade, e estes estão intimamente relacionados a estabilidade e concentração das espécies reativas, como observado neste estudo.

Uma vez que se observou ação dos LAPs sob células planctônicas de *C. albicans* investigou-se a ação sobre os biofilmes fúngicos. apresentaram o melhor potencial de redução fúngica, como o D1, D2 e S1, optou-se por seguir com os testes para biofilmes apenas com os LAPs originados a partir de plasma de argônio.

Os LAPs obtidos a partir de água destilada ativada com plasma de argônio se mostraram efetivos tanto na redução da viabilidade do biofilme de 24 horas, quanto de um biofilme maduro de 48 horas. Já o LAP obtido a partir de solução salina 0,9% ativada com plasma de argônio foi eficaz apenas na redução do biofilme maduro de 48 horas, não sendo efetivo para biofilme de 24 horas.

Hipóteses?

Prospectando aplicações *in vivo* futuras, realizou-se os ensaios de citotoxicidade utilizando as células Vero e os resultados tanto da toxicidade imediata quanto da citotoxicidade após 24 horas de contato mostraram que os LAPs gerados a partir de plasma de argônio mantiveram a viabilidade celular acima dos 70%, o que comprovou o perfil não tóxico dos LAPs.

Os resultados microbiológicos *C. albicans* em forma planctônica e de biofilme em contato com LAPs por 10 minuto e 30 minutos foram importantes, pois são um dos primeiros resultados na literatura com ação sobre biofilme destas

espécies, contudo esses tempos de tratamento precisem no futuro de ajustes pensando em aplicações clínicas futuras, principalmente na área de odontologia, tempos de exposição muito prolongados poderiam inviabilizar o tratamento. Contudo, pode-se estudar no futuro a otimização dos parâmetros para redução do tempo, ou então em sistemas de liberação controlado, ou até mesmo em utilizar o LAP como um veículo para dispersar um princípio ativo.

Por fim a união dos resultados microbiológicos com os de toxicidade revelaram um perfil promissor dos LAPs como uma terapia adjuvante no futuro em combate às infecções causadas por *C. albicans*.

6 CONCLUSÃO

A água destilada ativada com plasma de argônio, e com a mistura de argônio e ar comprimido apresentaram os melhores efeitos antifúngicos frente células planctônicas de *C. albicans* após 30 min de exposição. Para a solução salina, apenas a ativação por plasma de argônio apresentou resultados antifúngicos frente células planctônicas, após 30 min de exposição.

Em relação aos biofilmes de *C. albicans*, ambos os líquidos ativados com plasma de argônio apresentaram efeito antibiofilme após 30 min de exposição. Os melhores resultados de ação antifúngica foram observados nos grupos de LAPs que produziram maior concentração de peróxido de hidrogênio.

A composição de espécies reativas que apresentou os melhores efeitos antifúngicos para água destilada tratada com plasma de argônio, foi o nitrato em maior concentração, precedido do peróxido de hidrogênio, ácido nítrico, nitrito e ozônio, já para a solução salina tratada com plasma de argônio a composição com maior efetividade foi nitrato em maior concentração, seguido de nitrito, ácido nítrico, peróxido de hidrogênio e ozônio, ressaltando que nos grupos de salina tratado com plasma de ar comprimido e com a mistura dos gases argônio e ar comprimido, não foi detectada a presença de peróxido de hidrogênio.

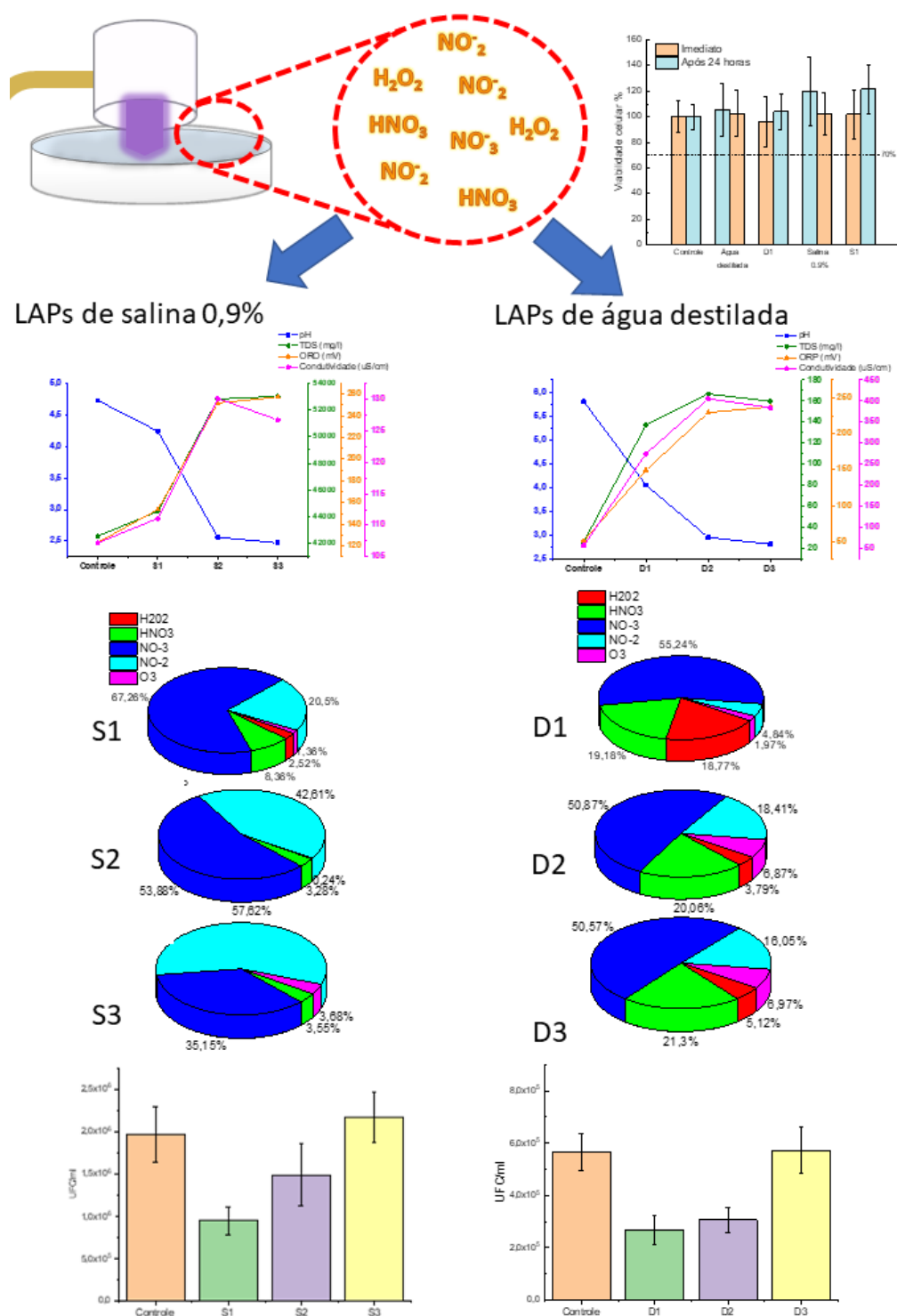
Foi possível determinar condições ideais de produção, indicadores físico-químicos de produção de espécies reativas como pH na faixa de 4 a 4,5, melhor fluxo de gás a uma vazão de 3,0 l/min e a melhor fonte de gás que foi o argônio.

Para a solução salina e água destilada o ORP ideal para início de produção de espécies reativas foi na faixa de 150 mV e condutividade para solução salina na faixa de 110 $\mu\text{S}/\text{cm}$, enquanto que para a água destilada os valores de condutividade foram na faixa de 275 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Esses resultados associados à baixa toxicidade dos líquidos ativados com

plasma de Argônio abrem um promissor e vasto campo na linha de terapias adjuvantes no combate a infecções causadas por este patógeno.

Figura 18: Graph abstract



Legenda: D1: água destilada ativada com Argônio; D2: água destilada ativada com Argônio e ar

comprimido; D3: água destilada ativada com ar comprimido; CS: salina controle, não ativada; S1: salina ativada com Argônio; S2: salina ativada com Argônio e ar comprimido; S3: salina ativada com ar comprimido.

Fonte: A autora.

REFERÊNCIAS*

Aparecida Delben J, Evelin Zago C, Tyhovych N, Duarte S, Eduardo Vergani C. Effect of atmospheric-pressure cold plasma on pathogenic oral biofilms and in vitro reconstituted oral epithelium. *PLoS One*. 2016b;11(5):1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0155427.

Bai F, Ran Y, Zhai S, Xia Y. Cold Atmospheric Plasma: A Promising and Safe Therapeutic Strategy for Atopic Dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2023; doi: 10.1159/000531967.

Bai Y, Idris Muhammad A, Hu Y, Koseki S, Liao X, Chen S, et al. Inactivation kinetics of *Bacillus cereus* spores by Plasma activated water (PAW). *Food Research International*. 2020;131. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109041.

Bauer G. The synergistic effect between hydrogen peroxide and nitrite, two long-lived molecular species from cold atmospheric plasma, triggers tumor cells to induce their own cell death. *Redox Biol*. 2019;26. doi: 10.1016/j.redox.2019.101291.

Belgacem Z Ben, Carre G, Charpentier E, Le-Bras F, Maho T, Robert E, et al. Innovative non-thermal plasma disinfection process inside sealed bags: Assessment of bactericidal and sporicidal effectiveness in regard to current sterilization norms. *PLoS One*. 2017;12(6). doi: 10.1371/journal.pone.0180183.

Bhatt S, Mehta P, Chen C, Daines DA, Mermel LA, Chen HL, et al. Antimicrobial efficacy and safety of a novel gas plasma-activated catheter lock solution. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(8). doi: 10.1128/AAC.00744-18.

Borges AC, de Moraes 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.

Borges AC, Nishime TMC, de Moura Rovetta S, Lima G de MG, Kostov KG, Thim GP, et al. Cold Atmospheric Pressure Plasma Jet Reduces *Trichophyton rubrum* Adherence and Infection Capacity. *Mycopathologia*. 2019;184(5):585–95. doi: 10.1007/s11046-019-00375-2.

Bourke P, Ziuzina D, Han L, Cullen PJ, Gilmore BF. Microbiological interactions with cold plasma. *J Appl Microbiol.* 2017;123(2):308–24. doi: 10.1111/jam.13429.

Chiappim W, Sampaio A da G, Miranda F, Fraga M, Petraconi G, da Silva Sobrinho A, et al. Antimicrobial effect of plasma-activated tap water on staphylococcus aureus, escherichia coli, and Candida albicans. *Water (Switzerland).* 2021a;13(11). doi: 10.3390/w13111480.

Chiappim W, Sampaio A, Miranda F, Petraconi G, da Silva Sobrinho A, Cardoso P, et al. Nebulized plasma-activated water has an effective antimicrobial effect on medically relevant microbial species and maintains its physicochemical properties in tube lengths from 0.1 up to 1.0 m. *Plasma Processes and Polymers.* 2021b;18(11). doi: 10.1002/ppap.202100010.

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.

Coughlan LM, Cotter PD, Hill C, Alvarez-Ordóñez A. New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. *Front Microbiol.* 2016;7(OCT). doi: 10.3389/fmicb.2016.01641.

Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. Candida albicans - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microb Pathog.* 2018;117:128–38. doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.028.

Dascalu A, Besleaga A, Shimizu K, Sirghi L. Activation of Water by Surface DBD Micro Plasma in Atmospheric Air. *Lecture Notes in Networks and Systems*, vol. 53. Springer; 2019. p. 97–104. doi: 10.1007/978-3-319-99834-3_13.

Dobrynin D, Fridman G, Friedman G, Fridman A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J Phys.* 2009;11. doi: 10.1088/1367-2630/11/11/115020.

Doria ACOC, Sorge C di PC, Santos TB, Brandão J, Gonçalves PAR, Maciel HS, et al. Application of post-discharge region of atmospheric pressure argon

and air plasma jet in the contamination control of candida albicans biofilms. *Revista Brasileira de Engenharia Biomedica*. 2015;31(4):358–62. doi: 10.1590/2446-4740.01215.

Ercan UK, Wang H, Ji H, Fridman G, Brooks AD, Joshi SG. Nonequilibrium plasma-activated antimicrobial solutions are broad-spectrum and retain their efficacies for extended period of time. *Plasma Processes and Polymers*. 2013;10(6):544–55. doi: 10.1002/ppap.201200104.

Fan FM, Liu Y, Liu YQ, Lv RX, Sun W, Ding WJ, et al. Candida albicans biofilms: antifungal resistance, immune evasion, and emerging therapeutic strategies. *Int J Antimicrob Agents*. 2022;60(5–6). doi: 10.1016/j.ijantimicag.2022.106673.

Faramarzi F, Zafari P, Alimohammadi M, Moonesi M, Rafiei A, Bekeschus S. Cold Physical Plasma in Cancer Therapy: Mechanisms, Signaling, and Immunity. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021. doi: 10.1155/2021/9916796.

Feng Y, Lu H, Whiteway M, Jiang Y. Understanding fluconazole tolerance in Candida albicans: implications for effective treatment of candidiasis and combating invasive fungal infections. *J Glob Antimicrob Resist*. 2023;35:314–21. doi: 10.1016/j.jgar.2023.10.019.

Figueira FR, Doria ACOC, Khouri S, Maciel HS, Pessoa RS, Ramos MAR. Effect of Storage Temperature on pH and Conductivity of Reverse Osmosis Water Treated with Atmospheric Plasma. vol. 8. 2018.

Gates D. Plasma: An International Open Access Journal for All of Plasma Science. *Plasma*. 2018;1(1):45–6. doi: 10.3390/plasma1010004.

Girard F, Badets V, Blanc S, Gazeli K, Marlin L, Authier L, et al. Formation of reactive nitrogen species including peroxyxynitrite in physiological buffer exposed to cold atmospheric plasma. *RSC Adv*. 2016;6(82):1–3. doi: 10.1039/c6ra12791fi.

Gorbanev Y, O'Connell D, Chechik V. Non-Thermal Plasma in Contact with Water: The Origin of Species. *Chemistry - A European Journal*. 2016;22(10):3496–505. doi: 10.1002/chem.201503771.

Gow NAR, Van De Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(2):112–22. doi: 10.1038/nrmicro2711.

Guo D, Liu H, Zhou L, Xie J, He C. Plasma-activated water production and its application in agriculture. *J Sci Food Agric.* 2021;101(12):4891–9. doi: 10.1002/jsfa.11258.

Hadinoto K, Niemira BA, Trujillo FJ. A review on plasma-activated water and its application in the meat industry. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2023a;22(6):4993–5019. doi: 10.1111/1541-4337.13250.

Hadinoto K, Rao NRH, Astorga JB, Zhou R, Biazik J, Zhang T, et al. Hybrid plasma discharges for energy-efficient production of plasma-activated water. *Chemical Engineering Journal.* 2023b;451. doi: 10.1016/j.cej.2022.138643.

Han QY, Wen X, Gao JY, Zhong CS, Ni YY. Application of plasma-activated water in the food industry: A review of recent research developments. *Food Chem.* 2023;405. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134797.

Hasim S, Coleman JJ. Targeting the fungal cell wall: Current therapies and implications for development of alternative antifungal agents. *Future Med Chem.* 2019;11(8):869–83. doi: 10.4155/fmc-2018-0465.

He M, Duan J, Xu J, Ma M, Chai B, He G, et al. *Candida albicans* biofilm inactivated by cold plasma treatment in vitro and in vivo. *Plasma Processes and Polymers.* 2020;17(4):1–9. doi: 10.1002/ppap.201900068.

Hoffmann C, Berganza C, Zhang J. *Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology.* 2013.

Hoppanová L, Kryštofová S. Nonthermal Plasma Effects on Fungi: Applications, Fungal Responses, and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2022;2022:11592. doi: 10.3390/ijms.

Hu X, Feng J, Ding T, Lv R. Correlation analysis of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) components in plasma activated water (PAW) and its inactivation of *Bacillus cereus* endospore. *Journal of Water Process Engineering.* 2023;56. doi: 10.1016/j.jwpe.2023.104332.

Hu X, Zhang Y, Wu RA, Liao X, Liu D, Cullen PJ, et al. Diagnostic analysis of reactive species in plasma-activated water (PAW): Current advances and outlooks. *J Phys D Appl Phys.* 2022;55(2). doi: 10.1088/1361-6463/ac286a.

Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. The role of *Candida albicans* stress response pathways in antifungal tolerance and resistance. *Cell Press.* 2022;25(103953):1–9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103953>.

Jabeen G, Naz SA, Rangel DEN, Jabeen N, Shafique M, Yasmeen K. In-vitro evaluation of virulence markers and antifungal resistance of clinical *Candida albicans* strains isolated from Karachi, Pakistan. *Fungal Biol.* 2023;127(7–8):1241–9. doi: 10.1016/j.funbio.2023.04.003.

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. doi: 10.1016/j.ajic.2009.11.002.

Keighley C, Gall M, Halliday CL, Chaw K, Newton P, Sintchenko V, et al. Breakthrough *Candida albicans* bloodstream infection associated with in vivo development of pan-azole resistance related to ERG3 gene deletion. *Pathology.* 2023; doi: 10.1016/j.pathol.2023.09.015.

Kim S, Kim CH. Applications of plasma-activated liquid in the medical field. *Biomedicines.* 2021;9(11). doi: 10.3390/biomedicines9111700.

Koban I, Matthes R, Hübner NO, Welk A, Meisel P, Holtfreter B, et al. Treatment of *Candida albicans* biofilms with low-temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. *New J Phys.* 2010;12. doi: 10.1088/1367-2630/12/7/073039.

Konchekov EM, Gusein-zade N, Burmistrov DE, Kolik L V., Dorokhov AS, Izmailov AY, et al. Advancements in Plasma Agriculture: A Review of Recent Studies. *Int J Mol Sci.* 2023;24(20). doi: 10.3390/ijms242015093.

Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, Van Dijk J, et al. Plasma medicine: An introductory review. *New J Phys.* 2009;11. doi: 10.1088/1367-2630/11/11/115012.

Kostov KG, Borges AC, Koga-Ito CY, Nishime TMC, Prsyazhnyi V, Honda RY. Inactivation of *Candida albicans* by Cold Atmospheric Pressure Plasma Jet.

IEEE Transactions on Plasma Science. 2015;43(3):770–5. doi: 10.1109/TPS.2014.2360645.

Lamichhane P, Acharya TR, Kaushik N, Nguyen LN, Lim JS, Hessel V, et al. Non-thermal argon plasma jets of various lengths for selective reactive oxygen and nitrogen species production. *J Environ Chem Eng*. 2022;10(3). doi: 10.1016/j.jece.2022.107782.

Laroussi M. Plasma Medicine: A Brief Introduction. *Plasma*. 2018;1(1):47–60. doi: 10.3390/plasma1010005.

Laroussi M. Sterilization of Contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE*. 1996;24(3).

Laroussi M, Mendis DA, Rosenberg M. Plasma interaction with microbes You may also like Rationalizing the permeation of polar antibiotics into Gram-negative bacteria. 2003.

Laurita R, Barbieri D, Gherardi M, Colombo V, Lukes P. Chemical analysis of reactive species and antimicrobial activity of water treated by nanosecond pulsed DBD air plasma. *Clin Plasma Med*. 2015;3(2):53–61. doi: 10.1016/j.cpme.2015.10.001.

Lee A, Lin A, Shah K, Singh H, Miller V, Gururaja Rao S. Optimization of non-thermal plasma treatment in an In Vivo model organism. *PLoS One*. 2016;11(8). doi: 10.1371/journal.pone.0160676.

Lewis JS, Graybill JR. Fungicidal versus fungistatic: What's in a word? *Expert Opin Pharmacother*. 2008;9(6):927–35. doi: 10.1517/14656566.9.6.927.

Lin L, Zhuo Y, Dong Q, Yang C, Cheng C, Liu T. Plasma activated Ezhangfeng Cuji as innovative antifungal agent and its inactivation mechanism. *AMB Express*. 2023;13(1). doi: 10.1186/s13568-023-01571-6.

Liu K, Liu ST, Ran CF. The Effect of Air-Water-Plasma-Jet-Activated Water on Penicillium: The Reaction of HNO₂ and H₂O₂ Under Acidic Condition. *Front Phys*. 2020a;8. doi: 10.3389/fphy.2020.00242.

Liu K, Liu ST, Ran CF. The Effect of Air-Water-Plasma-Jet-Activated Water on Penicillium: The Reaction of HNO₂ and H₂O₂ Under Acidic Condition. *Front Phys*. 2020b;8. doi: 10.3389/fphy.2020.00242.

Liu X, Li Y, Zhang R, Huangfu L, Du G, Xiang Q. Inactivation effects and mechanisms of plasma-activated water combined with sodium laureth sulfate (SLES) against *Saccharomyces cerevisiae*. *APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY*. 2021;2855-2865. doi: 10.1007/s00253-021-11227-9/Published.

Low A, Gavriilidis G, Larke N, B-Lajoie MR, Drouin O, Stover J, et al. Incidence of Opportunistic Infections and the Impact of Antiretroviral Therapy among HIV-Infected Adults in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;62(12):1595–603. doi: 10.1093/cid/ciw125.

Lunov O, Zablotskii V, Churpita O, Lunova M, Jirsa M, Dejneka A, et al. Chemically different non-thermal plasmas target distinct cell death pathways. *Sci Rep*. 2017;7(1). doi: 10.1038/s41598-017-00689-5.

Ma M, Zhang Y, Lv Y, Sun F. The key reactive species in the bactericidal process of plasma activated water. *J Phys D Appl Phys*. 2020;53(18). doi: 10.1088/1361-6463/ab703a.

Ma R, Yu S, Tian Y, Wang K, Sun C, Li X, et al. Effect of Non-Thermal Plasma-Activated Water on Fruit Decay and Quality in Postharvest Chinese Bayberries. *Food Bioproc Tech*. 2016;9(11):1825–34. doi: 10.1007/s11947-016-1761-7.

Ma Y, Sun T, Ren K, Min T, Xie X, Wang H, et al. Applications of cold atmospheric plasma in immune-mediated inflammatory diseases via redox homeostasis: evidence and prospects. *Heliyon*. 2023;9(12). doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e22568.

Mai-Prochnow A, Bradbury M, Ostrikov K, Murphy AB. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm response and resistance to cold atmospheric pressure plasma is linked to the redox-active molecule phenazine. *PLoS One*. 2015;10(6). doi: 10.1371/journal.pone.0130373.

Mai-Prochnow A, Clauson M, Hong J, Murphy AB. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Sci Rep*. 2016;6. doi: 10.1038/srep38610.

Malyavko A, Yan D, Wang Q, Klein AL, Patel KC, Sherman JH, et al. Cold atmospheric plasma cancer treatment, direct: Versus indirect approaches. *Mater Adv.* 2020;1(6):1494–505. doi: 10.1039/d0ma00329h.

Matějka F, Galář P, Khun J, Scholtz V, Kůsová K. Mechanisms leading to plasma activated water high in nitrogen oxides. *Phys Scr.* 2023;98(4). doi: 10.1088/1402-4896/acc48e.

Milhan NVM, Chiappim W, Sampaio A da G, da Cruz Vegian MR, Pessoa RS, Koga-ito CY. Applications of Plasma-Activated Water in Dentistry: A Review. *Int J Mol Sci.* 2022;23(8). doi: 10.3390/ijms23084131.

Miranda FS, Tavares VKF, Gomes MP, Neto NFA, Chiappim W, Petraconi G, et al. Physicochemical Characteristics and Antimicrobial Efficacy of Plasma-Activated Water Produced by an Air-Operated Coaxial Dielectric Barrier Discharge Plasma. *Water (Switzerland).* 2023a;15(23). doi: 10.3390/w15234045.

Miranda FS, Tavares VKF, Gomes MP, Neto NFA, Chiappim W, Petraconi G, et al. Physicochemical Characteristics and Antimicrobial Efficacy of Plasma-Activated Water Produced by an Air-Operated Coaxial Dielectric Barrier Discharge Plasma. *Water (Switzerland).* 2023b;15(23). doi: 10.3390/w15234045.

Mohades S, Laroussi M, Maruthamuthu V. Moderate plasma activated media suppresses proliferation and migration of MDCK epithelial cells. *J Phys D Appl Phys.* 2017;50(18). doi: 10.1088/1361-6463/aa678a.

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

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). doi: 10.1371/journal.pgen.1007319.

Narasimhan SL, Salvi D, Schaffner DW, Karwe M V., Tan J. Efficacy of cold plasma-activated water as an environmentally friendly sanitizer in egg washing. *Poult Sci.* 2023;102(10). doi: 10.1016/j.psj.2023.102893.

Neyts EC, Brault P. Molecular Dynamics Simulations for Plasma-Surface Interactions. *Plasma Processes and Polymers*. 2017;14(1–2). doi: 10.1002/ppap.201600145.

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

Omrani AS, FRCPATH F, Makkawy EA, Baig K, Baredhwan AA, Almuthree SA, et al. Ten-year review of invasive *Candida* infections in a tertiary care center in Saudi Arabia OPEN ACCESS. vol. 35. 2014.

Ouchi C, Hasebe A, Sakata K ichiro, Sato J, Yamazaki Y, Ohga N, et al. Genotypes and virulence-related activities of *Candida albicans* derived from oral cavity of patients in Hokkaido. *Arch Oral Biol*. 2024;157. doi: 10.1016/j.archoralbio.2023.105827.

Pang B, Liu Z, Wang S, Gao Y, Qi M, Xu D, et al. Alkaline plasma-activated water (PAW) as an innovative therapeutic avenue for cancer treatment. *Appl Phys Lett*. 2022;121(14). doi: 10.1063/5.0107906.

Reema, Khanikar RR, Bailung H, Sankaranarayanan K. Review of the cold atmospheric plasma technology application in food, disinfection, and textiles: A way forward for achieving circular economy. *Front Phys*. 2022;10. doi: 10.3389/fphy.2022.942952.

Reiazi R, Akbari ME, Norozi A, Etedadialiabadi M. Application of cold atmospheric plasma (CAP) in cancer therapy: A review. *Int J Cancer Manag*. 2017;10 10(3 3). doi: 10.5812/ijcp.8728.

Rothwell JG, Alam D, Carter DA, Soltani B, McConchie R, Zhou R, et al. The antimicrobial efficacy of plasma-activated water against *Listeria* and *E. coli* is modulated by reactor design and water composition. *J Appl Microbiol*. 2022;132(4):2490–500. doi: 10.1111/jam.15429.

Rovetta-Nogueira S de M, Borges AC, Oliveira Filho M de, Nishime TMC, Hein LR de O, Kostov KG, et al. Helium Cold Atmospheric Plasma Causes Morphological and Biochemical Alterations in *Candida albicans* Cells. *Molecules*. 2023;28(23). doi: 10.3390/molecules28237919.

- Sampaio A da G, Chiappim W, Milhan NVM, Botan Neto B, Pessoa R, Koga-Ito CY. Effect of the pH on the Antibacterial Potential and Cytotoxicity of Different Plasma-Activated Liquids. *Int J Mol Sci.* 2022;23(22). doi: 10.3390/ijms232213893.
- Schnabel U, Yarova K, Zessin B, Stachowiak J, Ehlbeck J. The combination of plasma-processed air (PPA) and plasma-treated water (PTW) causes synergistic inactivation of *Candida albicans* SC5314. *Applied Sciences (Switzerland).* 2020;10(9). doi: 10.3390/app10093303.
- Serrano-Fujarte I, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M. Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. *Microb Pathog.* 2016;90:22–33. doi: 10.1016/j.micpath.2015.10.001.
- Shah N, Ray JG, Kundu S, Sardana D. Surgical management of chronic hyperplastic candidiasis refractory to systemic antifungal treatment. *J Lab Physicians.* 2017;9(02):136–9. doi: 10.4103/0974-2727.199622.
- Shaji M, Rabinovich A, Surace M, Sales C, Fridman A. Physical Properties of Plasma-Activated Water. *Plasma.* 2023;6(1):45–57. doi: 10.3390/plasma6010005.
- Shaw P, Kumar N, Kwak HS, Park JH, Uhm HS, Bogaerts A, et al. Bacterial inactivation by plasma treated water enhanced by reactive nitrogen species. *Sci Rep.* 2018;8(1). doi: 10.1038/s41598-018-29549-6.
- Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(8):662–80. doi: 10.1038/nrd2222.
- Takeda S, Yamada S, Hattori N, Nakamura K, Tanaka H, Kajiyama H, et al. Intraperitoneal Administration of Plasma-Activated Medium: Proposal of a Novel Treatment Option for Peritoneal Metastasis From Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2017;1188–94. doi: 10.1245/s10434-016-5759-1.
- Tampieri F, Gorbanev Y, Sardella E. Plasma-treated liquids in medicine: Let's get chemical. *Plasma Processes and Polymers.* 2023;20(9). doi: 10.1002/ppap.202300077.
- Thirumdas R, Kothakota A, Annapure U, Siliveru K, Blundell R, Gatt R, et al. Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties,

applications in food and agriculture. *Trends Food Sci Technol*. 2018;77:21–31. doi: 10.1016/j.tifs.2018.05.007.

Traylor MJ, Pavlovich MJ, Karim S, Hait P, Sakiyama Y, Clark DS, et al. Long-term antibacterial efficacy of air plasma-activated water. *J Phys D Appl Phys*. 2011;44(47). doi: 10.1088/0022-3727/44/47/472001.

Tsoukou E, Bourke P, Boehm D. Temperature stability and effectiveness of plasma-activated liquids over an 18 months period. *Water (Switzerland)*. 2020;12(11):1–18. doi: 10.3390/w12113021.

Tsoukou E, Delit M, Treint L, Bourke P, Boehm D. Distinct chemistries define the diverse biological effects of plasma activated water generated with spark and glow plasma discharges. *Applied Sciences (Switzerland)*. 2021;11(3):1–18. doi: 10.3390/app11031178.

Vlad IE, Martin C, Toth AR, Papp J, Anghel SD. BACTERIAL INHIBITION EFFECT OF PLASMA ACTIVATED WATER. vol. 71. 2019a.

Vlad IE, Martin C, Toth AR, Papp J, Anghel SD. BACTERIAL INHIBITION EFFECT OF PLASMA ACTIVATED WATER. vol. 71. 2019b.

Wanachantararak P, Suanpoot P, Nisoa M. Inhibitory activity of cold atmospheric plasma on candida albicans. *Walailak J Sci Technol*. 2019;16(6):401–8. doi: 10.48048/wjst.2019.4811.

Wang GM, Sun PP, Pan H, Ye GP, Sun K, Zhang J, et al. Inactivation of *Candida albicans* Biofilms on Polymethyl Methacrylate and Enhancement of the Drug Susceptibility by Cold Ar/O₂ Plasma Jet. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 2016;36(2):383–96. doi: 10.1007/s11090-015-9656-3.

Weltmann KD, Von Woedtke T. Plasma medicine - Current state of research and medical application. *Plasma Phys Control Fusion*. 2017;59(1). doi: 10.1088/0741-3335/59/1/014031.

Wertheimer MR, Coulombe S. Plasma Medicine (Wertheimer/Coulombe). *Physics in Canada*. 2012;68(4):489–192.

Wiegand C, Fink S, Hipler U-C, 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.v5i0.22434.

Wong KS, Chew NSL, Low M, Tan MK. Plasma-Activated Water: Physicochemical Properties, Generation Techniques, and Applications. *Processes*. 2023;11(7). doi: 10.3390/pr11072213.

Wu Y, Chen Y, Lu H, Ying C. Miltefosine exhibits fungicidal activity through oxidative stress generation and Aif1 activation in *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents*. 2023;62(1). doi: 10.1016/j.ijantimicag.2023.106819.

Xia B, Vyas HKN, Zhou R, Zhang T, Hong J, Rothwell JG, et al. The importance of superoxide anion for *Escherichia coli* biofilm removal using plasma-activated water. *J Environ Chem Eng*. 2023;11(3). doi: 10.1016/j.jece.2023.109977.

Xu D, Liu D, Wang B, Chen C, Chen Z, Li D, et al. In situ OH generation from O₂-and H₂O₂ plays a critical role in plasma-induced cell death. *PLoS One*. 2015;10(6). doi: 10.1371/journal.pone.0128205.

Xu H, Fang C, Huang Q. Achieving improved efficiency for removal of aflatoxin B₁ by combination use of cold atmospheric-pressure plasma and plasma-activated water. *Journal of Water Process Engineering*. 2023;54. doi: 10.1016/j.jwpe.2023.104004.

Xu Y, Tian Y, Ma R, Liu Q, Zhang J. Effect of plasma activated water on the postharvest quality of button mushrooms, *Agaricus bisporus*. *Food Chem*. 2016;197:436–44. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.144.

Yang L, Niyazi G, Qi Y, Yao Z, Huang L, Wang Z, et al. Plasma-activated saline promotes antibiotic treatment of systemic methicillin-resistant staphylococcus aureus infection. *Antibiotics*. 2021;10(8). doi: 10.3390/antibiotics10081018.

Zhang Q, Zhang J, Zhang Y, Sui Y, Du Y, Yang L, et al. Antifungal and anti-biofilm activities of patchouli alcohol against *Candida albicans*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2024;314. doi: 10.1016/j.ijmm.2023.151596.

Zhao YM, Patange A, Sun DW, Tiwari B. Plasma-activated water: Physicochemical properties, microbial inactivation mechanisms, factors influencing antimicrobial effectiveness, and applications in the food industry. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020;19(6):3951–79. doi: 10.1111/1541-4337.12644.

Zhou Renwu, Zhou Rusen, Prasad K, Fang Z, Speight R, Bazaka K, et al. Cold atmospheric plasma activated water as a prospective disinfectant: The crucial role of peroxy nitrite. *Green Chemistry.* 2018;20(23):5276–84. doi: 10.1039/c8gc02800a.