

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor
(a), o texto completo desta tese será
disponibilizado a partir de

12/09/2020



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

SABRINA DE MOURA ROVETTA

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

2019

SABRINA DE MOURA ROVETTA

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

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

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

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

São José dos Campos

2019

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

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

Rovetta, Sabrina de Moura

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

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

Orientadora: Cristiane Yumi Koga-ito

Coorientadora: Aline Chiodi Borges

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Guilherme Rodrigues Teodoro

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Walter Miyakawa

Instituto de Estudos Avançados - IEAv

Divisão de Fotônica

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 12 de setembro de 2019.

DEDICATÓRIA

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

O jato de plasma frio sob pressão atmosférica tem mostrado efeito

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

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

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

As técnicas microscópicas convencionais, como microscopia óptica e

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

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

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

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

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

2 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Paw J, Kwiatkowski M, Terebun P, Chudzik B, Ğ MG, Treatment AP. *Candida albicans* inactivation with DBD He / O 2 plasma jet. *IEEE*. 2017:1–4.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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