

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

INATIVAÇÃO DE *Candida auris* POR ÁGUA ATIVADA POR PLASMA NÃO TÉRMICO

Isabela dos Santos Passos, Iadna Paula Alves de Sousa, Sônia Khouri
Sibelino, Anelise Cristina Osório César Dória.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi,
2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, dspassosisabela@gmail.com,
iadnaalves@outlook.com, skkhouiri@gmail.com, ane.doria@gmail.com

Resumo

Candida auris é uma espécie de levedura resistente encontrada em ambientes hospitalares, podendo causar infecções graves devido a mutações em seu gene ERG11, responsável pela resistência a medicamentos antifúngicos. A pesquisa busca avaliar um método de controle em cepa padrão de *C. auris*, com a aplicação de água ativada com plasma não térmico (PAW). O estudo utilizou água ambiente e refrigerada ativada com plasma *gliding arc* por 15 minutos e 120 minutos de contato com a cepa padrão de *C. auris*. Após a incubação, uma alíquota do inóculo foi semeada pela técnica da gota e incubada para contagem das UFC/ml. Possíveis alterações foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura. Comparando o grupo de controle com o de água refrigerada, houve diferença estatisticamente significativa. Entretanto, o grupo de controle e água ambiente, não demonstrou diferença estatisticamente significativa. Desse modo, o grupo de controle e o grupo que utilizou água refrigerada reforçam a notável capacidade antimicrobiana da PAW em temperaturas mais baixas.

Palavras-chave: Água ativada por plasma. *Candida auris*. Inativação.

Área do Conhecimento: Biomedicina.

Introdução

O gênero *Candida spp.* apresenta diversas espécies de relevância clínica e biológica, espalhadas pelo mundo, desde espécies comensais até as que afetam os seres humanos de diferentes maneiras, causando doenças. Essas doenças podem variar desde micoses superficiais, em geral benignas por não ativar resposta imune, até infecções sistêmicas graves. Estima-se que 70 a 90 % das infecções fúngicas humanas sejam provocadas pelo gênero *Candida spp.*, devido à sua alta frequência de colonização e infecções oportunistas na corrente sanguínea de humanos (FIGUEIRA *et al.*, 2016, MELO *et al.*, 2022). Entre as espécies de *Candida spp.* potencialmente multirresistentes, destaca-se a *Candida auris*, levedura descrita pela primeira vez em 2009, no Japão, por estar relacionada a grandes surtos de infecções invasivas em centros de saúde em todo o mundo nos últimos anos. Foram identificadas amostras em vários sítios anatômicos de pacientes de países da Europa, América do Norte, América do Sul, Ásia, África e Oceania. A levedura *C. auris* tem a habilidade de sobreviver em superfícies como paredes e leitos hospitalares, o que favorece sua disseminação no ambiente hospitalar. Por esse motivo causa infecções hematogênicas e outras infecções invasivas, especialmente em pacientes com comorbidades e imunossupressão especialmente em internados em unidades de terapia intensiva (UTI) (ANTUNES *et al.*, 2020, BORGES; NASCIMENTO, 2021).

A grande preocupação em torno desse fungo é sua alta resistência a agentes antifúngicos, que podem ser fungistáticos, inibidores de crescimento ou fungicidas, ocasionando a lise de microrganismos que atuam no ergosterol, principal esteroide presente no plasma e nas membranas mitocondriais dos fungos (MELO *et al.*, 2022). Sendo assim, *C. auris* é considerada um fungo emergente que simboliza uma séria ameaça à saúde pública. Isso se deve às suas mutações no gene ERG11, responsável pela resistência aos azóis e em genes envolvidos na atividade da bomba de efluxo, devido a isso apresenta

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

resistência às três classes de antifúngicos os azóis, anfotericina B e equinocandinas (ANTUNES *et al.*, 2020, BORGES; NASCIMENTO, 2021).

O desenvolvimento de tolerância e resistência deste microrganismo requer estudos adicionais quanto ao uso de outros métodos de inativação, como o de plasma atmosférico, que apresentou alto potencial na inibição microbiana. Os plasmas podem ser classificados de acordo com as condições de trabalho, quanto os níveis de energia dos elétrons e espécies reativas. Diferentes tipos de espécies ativas são relevantes para os efeitos antimicrobianos do plasma. Essas espécies podem diferir dependendo do gás utilizado na formação do plasma e do método escolhido para gerá-lo e, em altas dosagens causam estresse oxidativo relacionado ao envelhecimento celular e apoptose. Os Plasmas elétricos não térmicos em pressão atmosférica (*Low Temperature Atmospheric Pressure Plasmas*, LTAPP) quando em contato com líquidos são rica fonte de agentes altamente oxidantes e radicais redutores. A interação plasma-líquido está ganhando mais atenção visto que apresenta resultados promissores para muitas aplicações como o tratamento de água (FIGUEIRA *et al.*, 2016, FIGUEIRA, 2019, DORIA, 2019).

Desse modo, a presente pesquisa tem por finalidade comparar diferentes protocolos de água ativada com plasma não térmico (PAW), em diferentes temperaturas e seu impacto na viabilidade de células planctônicas de *C. auris* (CDC B11903).

Metodologia

Nesta pesquisa experimental foi utilizada cepa (CDC B11903) da espécie *Candida auris*, mantida e processada no Laboratório de Biotecnologia e Plasma Elétricos do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

Um volume de 250ml de água de osmose reversa foi coletado através do sistema purificador do modelo OS 10 LXE, pertencente a marca Gehaka, uma amostra de água de osmose reversa foi refrigerada a 3°C em uma geladeira (Cônsul do modelo CRD37) por 24h, enquanto outra amostra foi mantida em temperatura ambiente. As amostras foram ativadas utilizando o plasma do tipo *gliding arc*, com potência de 18,4W e 60Hz de frequência, com fluxo de gás de 6 L/min de Argônio e 4 L/min de ar comprimido para geração da descarga. A distância utilizada entre o bocal e a amostra (superfície da água) foi de 2mm com um tempo de ativação de 15 minutos e 120 minutos de contato com o microrganismo.

Dentre as PAWS estudadas a PAW refrigerada apresentou uma maior redução do pH, baixando de 7,04 para 3,41 imediatamente após a ativação. Já a PAW em temperatura ambiente apresentou uma redução inicial do pH de 7,05 para 3,61.

Um inóculo, com Densidade Óptica (DO) de 0,3 em 625 nm foi preparado em solução de Cloreto de Sódio 0,9% e centrifugado a 4000rpm por 15 min e o pellet, ressuspenso em 5mL de PAW e incubado por 120 min (agitado em vórtex a cada 20 min). As amostras-controle foram incubadas em água sem tratamento. Após a incubação do microrganismo na PAW, uma alíquota de 10µl de uma diluição 1:10⁴ do inóculo foi semeado em Sabouraud Dextrose pela técnica da gota e incubado a 37°C por 24h para contagem das UFC/ml.

Para analisar possíveis alterações nas características estruturais, inóculos (60 µL) obtidos de cada grupo foram transferidos para lamínulas de vidro estéreis, que após secagem *overnight* em temperatura ambiente, passaram pelo processo de metalização da superfície com o recobrimento de ouro através do metalizador Emitech modelo K550X, permitindo a utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) modelo EVO MA 10 (Zeiss) localizado na Central Analítica Multiusuário do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

Para a realização da análise estatística, o método ANOVA foi empregado, para avaliar a presença de diferenças significativas entre os grupos, com a finalidade de afastar a possibilidade de que os resultados sejam casuais.

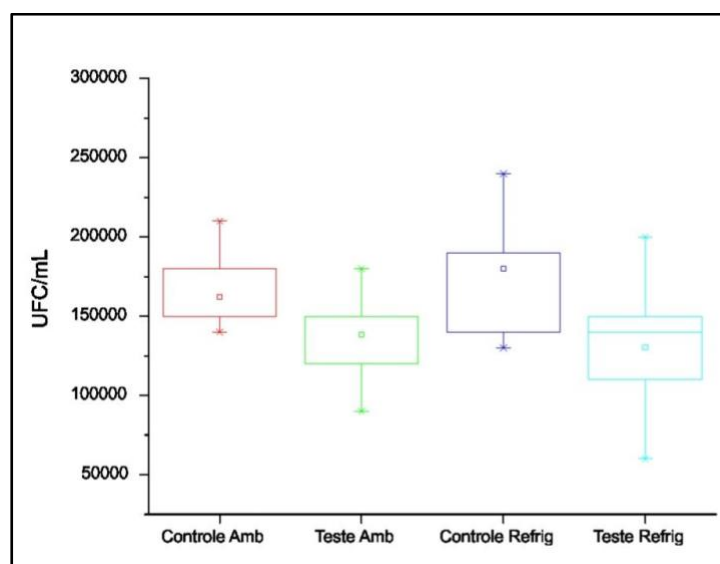
A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Resultados

Para os resultados foi utilizado o método de ANOVA e pós-teste de Tukey, para avaliar as diferenças significativas entre os grupos testes, quando comparados com o grupo controle, os resultados são apresentados na Figura 1 e na tabela 1.

O gráfico da Figura 1 faz uma comparação entre os grupos controle e os grupos teste com cada condição de ativação da água (ambiente e refrigerada), avaliando a contagem de unidades formadoras de colônias e nível de significância de 5%.

Figura 1 - Dispersão e distribuição dos valores dos grupos controle e grupos tratados com água ativada por plasma *gliding arc* utilizando a representação boxplot.



Fonte: o autor (2023).

Ademais, na Tabela 1 é possível observar a média das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos grupos controles e testes e o percentual de redução que foi obtido através do cálculo

$$\% \text{ de redução} = \frac{\text{contagem controle} - \text{contagem teste}}{\text{contagem controle}} \times 100$$

onde, considerando o grupo controle ambiente e teste ambiente a redução foi de 14,61% e considerando o grupo controle refrigerada e teste refrigerada o percentual de redução foi de 27,60%.

Tabela 1 - Comparação entre grupos tratados com plasma *gliding arc* e grupos controle com nível de significância de 5% no pós-teste de Tukey e percentual de redução.

Grupo	Média UFC/mL	% de redução	valor-p
Controle Ambiente	1,62x10 ⁵		
Teste Ambiente	1,38 x10 ⁵	14,61%	0,15923
Controle Refrigerado	1,80 x10 ⁵		
Teste Refrigerado	130 x10 ⁵	27,60%	8,65x10 ⁻⁴

Fonte: o autor (2023).

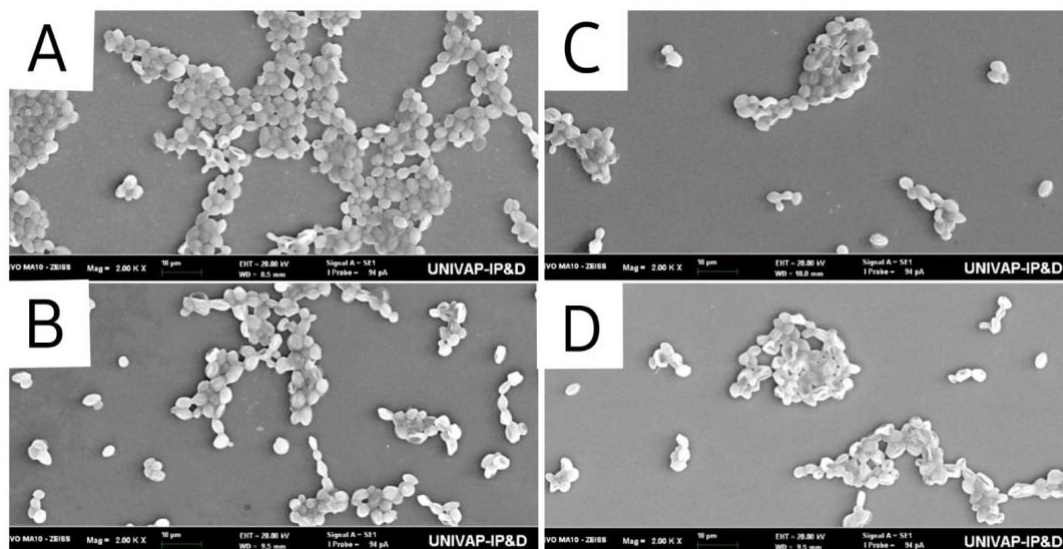
Com base nos resultados obtidos, é possível observar uma redução nos grupos submetidos às condições ambiente e refrigerada. Ao comparar o grupo de controle com o grupo de teste que utilizou

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

água refrigerada, observou-se um resultado estatisticamente significativo. No entanto, ao analisar a comparação entre o grupo de controle e o grupo de teste que usou água ambiente, não foi observada redução de significância estatística.

Em relação a técnica qualitativa da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) realizado nos grupos ambiente e refrigerada, foi possível diagnosticar que não houve mudanças perceptíveis na morfologia celular entre os grupos controle e teste, que estão representados nas Figuras 2.

Figura 2 - Micrografia de amostras dos grupos de água ambiente e refrigerada.



(A) Controle ambiente, (B) Teste ambiente, (C) Controle refrigerada e (D) Teste refrigerada.

Magnificação 2.00 KX.

Fonte: o autor (2023).

Discussão

A busca por novas técnicas de descontaminação é um processo que requer constantes inovações nas pesquisas clínicas. A água ativada por plasma não térmico (PAW) surge como um método inovador que está sendo investigado para a descontaminação de superfícies e materiais biológicos, demonstrando um eficaz efeito antimicrobiano.

A PAW se destaca por sua diversidade de parâmetros que podem ser ajustados para sua geração. Fatores como a composição de gases, potência elétrica, sistema de plasma e a distância entre o bocal e a superfície impactam diretamente a eficácia antimicrobiana da PAW. Para produzir a PAW, foi selecionada a água de osmose reversa, que foi resfriada a 4°C e mantida em temperatura ambiente a 27°C. Essa escolha foi baseada na compreensão de que a solubilidade de gases na água diminui conforme a temperatura aumenta (ALMEIDA, 2023).

Em um estudo conduzido por Pang e sua equipe em 2021, a água foi ativada em quatro temperaturas diferentes: 4°C, 25°C, 40°C e 70°C. Os resultados indicaram que temperaturas mais altas resultaram em maior taxa de evaporação da água. Além disso, observou-se que a água a 25°C apresentava uma concentração mais elevada de espécies reativas em comparação com a água a 4°C. Isso se deve ao fato de que a água a 4°C possui ligações de hidrogênio mais fortes, dificultando a absorção dos gases. O estudo revelou que a PAW refrigerada a 4°C exibia uma ação antimicrobiana mais eficaz quando comparada à PAW a 27°C, que levava a um maior aumento de temperatura.

Em estudo realizado por Almeida (2023), utilizando os mesmos parâmetros, verificou-se uma redução das unidades formadoras de colônias (UFCs/mL) entre 3-4 log para todos os microrganismos analisados, sendo eles, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Porém, o

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

presente estudo, avaliando uma levedura resistente, demonstrou efeito antimicrobiano menor das unidades formadoras de colônias (UFCs/mL).

Um estudo conduzido por Rossato (2018) destacou que um dos principais desafios na compreensão da patogenidade de *C. auris* está relacionado à presença de muitas proteínas não caracterizadas e hipotéticas em seu genoma. A relação dessas proteínas com características específicas que impulsionam sua agressividade como patógeno ainda não está clara. Embora o genoma completo de *C. auris* tenha sido recentemente investigado, nosso entendimento sobre o papel de diferentes genes em sua patogenidade e virulência ainda é limitado. Dessa forma, a pesquisa em torno da PAW e a compreensão da genômica de patógenos como *C. auris* são aspectos essenciais para avançar na eficácia da descontaminação e na compreensão dos mecanismos de virulência microbiana.

Conclusão

Em síntese, os resultados deste estudo revelam uma diminuição da viabilidade celular nos grupos expostos às condições de água ativada por plasma não térmico (PAW) tanto em ambiente quanto em refrigeração. Isso enfatiza a promissora eficácia da PAW como método de descontaminação. A diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo que utilizou água refrigerada reforça a ação antimicrobiana da PAW em temperaturas mais baixas. No entanto, é importante destacar que a comparação entre o grupo controle e o grupo teste ambiente não resultou em uma redução estatisticamente significativa. Nesse contexto, onde se busca incessantemente avanços em técnicas de descontaminação, a PAW se destaca como uma abordagem inovadora e eficaz, conforme evidenciado nesta pesquisa.

Referências

ALMEIDA, Felipe Santos. Avaliação da ação antimicrobiana da água ativada por plasma sobre membrana amniótica. 2023. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, [S. I.], 2023.

ANTUNES, Francisco et al. *Candida auris*: o surgimento recente de fungos patogênicos multirresistentes. Acta Médica Portuguesa, [SI], v. 33, n. 10, pág. 680-684, out. 2020. ISSN 1646-0758. DOI: <https://doi.org/10.20344/amp.12419>

BORGES, Francis; NASCIMENTO, Thiago. *Candida auris*: patógeno fúngico emergente é detectado no Brasil. HU Revista Editorial, [S. I.], p. 1-2, 5, 2021.

DORIA, Anelise. Interação plasma-biofilme fúngico: caracterização do plasma elétrico e do processo de inativação de cepas do gênero *Candida*. 2019. 184 p. Tese de doutorado (Doutor em Engenharia Biomédica.) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, [S. I.], 2019.

FIGUEIRA, Fernanda. Monitoramento de parâmetros físico- químicos e microbiológicos de diferentes tipos de água tratadas por plasma atmosférico. 2019. Dissertação de Mestrado (Biomédica.) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, [S. I.], 2019

FIGUEIRA, F.R., TORELLO, G.R., OLIVEIRA, A.L.S., LIMA, J.S.B., FIGUEIRA, J.A.N., MACIEL, H.S., PESSOA, R.S., DORIA, A.C.O.C., KHOURI, S. 2016. Ação antifúngica de um jato de plasma não-térmico de hélio/ar comprimido sobre biofilmes de *Candida albicans*. XX Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica, XVI Encontro Latino-Americano de Pós-Graduação e VI Encontro de Iniciação à Docência – Universidade do Vale do Paraíba.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

MELO, Isadora Souza Ferraz et al. *Candida sp*, uma breve revisão bibliográfica. *recisatec – revista científica saúde e tecnologia*, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://recisatec.com.br/index.php/recisatec/article/view/129>. Acesso em: 3 ago. 2023

ROSSATO, Luana; COLOMBO, Agnaldo Lopes. *Candida auris*: O que aprendemos sobre seus mecanismos de patogenicidade. *Virulência de Candida auris*, *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018.

PANG, B. et al. Discharge mode transition in a He/Ar atmospheric pressure plasma jet and its inactivation effect against tumor cells in vitro. *Journal of Applied Physics*, v. 130, n. 15, out. 2021.

Agradecimentos

Nossos sinceros agradecimentos à M.Sc Priscila Maria Sarmeiro Correa Marciano Leite, responsável pela Central de Laboratórios Multiusuário do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, pelo tempo e toda a ajuda dispensados para a realização dessa pesquisa.