

MARTA MAJEWSKI

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE CEPAS DE *Candida*
ISOLADAS DE PACIENTES SUBMETIDOS À ANTIBIOTICOTERAPIA
PROLONGADA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do Título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

MARTA MAJEWSKI

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE CEPAS DE *Candida*
ISOLADAS DE PACIENTES SUBMETIDOS À ANTIBIOTICOTERAPIA
PROLONGADA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do Título de MESTRE pelo Programa de Pós Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2008

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

Bellini AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos:FOSJC/UNESP; 2006.

Majewski, Marta

Efeitos da terapia fotodinâmica sobre cepas de *Candida* isoladas de pacientes submetidos à antibioticoterapia prolongada./ Marta Majewski; orientadora Juliana Campos Junqueira. __ São José dos Campos, 2008. 70p. ; IL.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, área Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2008.

1. *Candida* spp. 2. terapia fotodinâmica. 3. laser de baixa potência. 4. azul de metileno. 5. azuleno. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. II, Título.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, / /

Assinatura:

Email:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Majewski M. Efeitos da terapia fotodinâmica sobre cepas de *Candida* isoladas de pacientes submetidos à antibioticoterapia prolongada [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2008.

São José dos Campos,

Banca Examinadora

1) Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos / UNESP

Titulação: Professora Assistente Doutora

2) Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos / UNESP

Titulação: Professor Titular

3) Prof. Dr. Aginaldo Silva Garcez Segundo

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / IPEN da
Universidade de São Paulo / USP

Titulação: Doutor

DEDICATÓRIA

**À Deus que permitiu esse acontecimento
grandioso em minha vida**

**À Nossa Senhora sempre mãe
carinhosa ao meu lado**

**À minha mãe Maria Kunzler Nicolini, por sua incansável luta em fazer
de mim pessoa íntegra e temente à Deus.**

**Ao meu marido Stefan por todo incentivo
e motivação nestes 25 anos de união e convivência**

**Aos meus filhos Stefânia, Marcelo, Anna e Ryszard,
todo meu amor e carinho**

**Á minha irmã Giovana, por sua amizade e cumplicidade,
todo o meu carinho**

**À minha amiga e terapeuta Carolina Bruno, por me ajudar a
encontrar o equilíbrio e serenidade para execução deste trabalho**

Agradecimento Especial

**À Professora Doutora Juliana Campos Junqueira, pela orientação,
disponibilidade e paciência ao longo desse trabalho**

**Ao Professor Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge, pela amizade
e por ter acreditado no meu potencial e vontade de crescer**

**À Professora Doutora Cristiane Yumi Koga Ito,
que sempre me acolheu como colega e amiga**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor Prof. Dr. José Roberto Rodrigues e do vice-diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na coordenação da Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito e Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo concedida.

À Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos, pela disponibilidade e participação na banca examinadora do Exame Geral de Qualificação.

À Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira, por sua amizade e incentivo.

Aos amigos Francine e Luciano, pela amizade e motivação.

À Maria de Fátima Pires, por seu carinho e acolhimento.

À Sílvia Scarpel, por sua atenção e colaboração.

Às secretárias da Seção de Pós-Graduação Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Lílian Faris das Graças e Maria Aparecida Consíglío de Souza, pela ajuda e informações dispensadas.

Às bibliotecárias Silvana Alvarez e Neide do Nascimento, pela disponibilidade em atender sempre que necessário.

Ao professor Egberto Munin do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) por sua colaboração em aferir o aparelho de laser.

À Silvia Maria Rodrigues Querido, que gentilmente cedeu as cepas de microrganismos utilizadas neste trabalho.

Aos alunos de Iniciação científica Rodrigo e Rodnei pela amizade e carinho.

À Megg aluna de graduação por sua ajuda em parte do experimento.

À Majew-engenharia-LTDA, pela confecção do suporte do laser para realização da terapia fotodinâmica *in vitro*.

Aos meus colegas de laboratório, pela convivência amiga e fraterna.

A todos que de alguma forma rezaram ou contibuíram indiretamente para realização deste trabalho.

“Se pudéssemos ter consciência do quanto nossa vida é efêmera, talvez pensássemos duas vezes antes de jogar fora as oportunidades que temos de ser e de fazer os outros felizes. Muitas flores são colhidas cedo demais. Algumas, mesmo ainda em botão. Há sementes que nunca brotam e há aquelas flores que vivem a vida inteira até que pétalas por pétala, tranqüilas, vividas, se entregam ao vento. Mas a gente não sabe adivinhar. A gente não sabe por quanto tempo estará enfeitando esse Éden e tampouco aquelas flores que foram plantadas ao nosso redor. E descuidamos. Cuidamos pouco, de nós, dos outros.”

Autor Desconhecido

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	9
Resumo.....	10
1 Introdução	11
2 Revisão da literatura	14
2.1 Gênero <i>Candida</i>	14
2.2 Laser.....	19
2.3 Fotossensibilizador.....	21
2.4 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT).....	24
3 Proposição	30
4 Material e método	31
4.1 Cepas de <i>Candida</i>	31
4.2 Preparo da suspensão de <i>Candida</i>	32
4.3 Fotossensibilizador.....	32
4.4 Laser de baixa intensidade.....	33
4.5 Fotossensibilização <i>in vitro</i>	33
4.6 Análise estatística	35
5 Resultado	36
6 Discussão	41
7 Conclusão	46
8 Referências.....	47
Anexos	65
<i>Abstract</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AM = Azul de metileno

AsGa = Arseneto de Gálio

AsGaAl = Arseneto de Gálio Alumínio

AT = Azul de toluidina

AZ =Azuleno

cm² = centímetro quadrado

C = controle

DE = Densidade de energia

FS= Fotossensibilizador

g = grama

HeNe = Hélio Neônio

HIV = Vírus da Imunodeficiência Humana

J = joule

L = Laser

Log = logaritmo

mL = mililitro

NaCl = cloreto de sódio

nm = nanômetro

PACT = *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy*

PDT= *Photodynamic Therapy*

PT = Prótese Total

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

W = Watts

TFD = Terapia Fotodinâmica

% = porcentagem

°C = grau Celcius

MAJEWSKI M. Efeitos da terapia fotodinâmica sobre cepas de *Candida* isoladas de pacientes submetidos à antibioticoterapia prolongada [dissertação]. São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2008.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica, utilizando-se os fotossensibilizadores azul de metileno e azuleno associados ao laser em baixa intensidade, sobre cepas de *Candida* isoladas da cavidade bucal humana. Foram estudadas 20 cepas de *Candida*, sendo 5 *C. albicans*, 4 *C. tropicalis*, 4 *C. glabrata*, 2 *C. parapsilosis*, 2 *C. kefyr*, 1 *C. krusei*, 1 *C. stellatoidea* e 1 *C. lipolytica*. Cada cepa foi submetida a 6 condições experimentais: associação de laser em baixa intensidade com 660 nm e azul de metileno (L+AM+), associação de laser e azuleno (L+AZ+), irradiação com laser (L+F-), tratamento com azul de metileno (L-AM+), tratamento com azuleno (L-AZ+) e tratamento apenas com solução fisiológica como controle (L-F-). Após o tratamento de cada cepa, foram realizadas diluições seriadas e semeaduras em ágar Sabouraud dextrose. Os dados de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados demonstraram que todos os grupos tratados com laser (L+AM+, L+AZ+ e L+F-) apresentaram médias de UFC/mL (Log) inferiores aos grupos sem laser (L-AM+, L-AZ+ e L-F-). Os grupos com terapia fotodinâmica (L+AM+ e L+AZ+) apresentaram média de UFC/mL (Log) semelhante ou superior ao grupo L+F-. Concluiu-se que as cepas de *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes submetidos à antibioticoterapia prolongada foram resistentes a terapia fotodinâmica com azul de metileno e azuleno nos parâmetros utilizados neste trabalho.

PALAVRAS - CHAVE: *Candida* spp.; terapia fotodinâmica; laser de baixa potência; azul de metileno; azuleno

1 INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* são microrganismos oportunistas, presentes na cavidade bucal, órgão genital e membranas mucosas de aproximadamente 75% da população saudável, podendo viver comensalmente sem causar danos ou qualquer prejuízo ao hospedeiro (APPLETON³, 2000; PIRES et al.⁷⁹, 2001). São fungos dimórficos que podem passar de leveduras para forma hifal, dependendo das condições de crescimento (MALTSUKI et al.⁵⁷, 2006).

Essas leveduras exibem uma variedade de fatores de virulência para colonizar os tecidos do hospedeiro. Um dos fatores mais importantes são os mecanismos de aderência, que possibilitam a colonização do microrganismo em diversas áreas do organismo. As leveduras do gênero *Candida* são hábeis em produzir enzimas extracelulares que facilitam a aderência e penetração no tecido hospedeiro (COTTER e KAVANAGH²², 2000; MAZA et al.⁵⁹, 2002; YILDIRIM et al.¹¹⁹, 2005).

Candida albicans e espécies relacionadas podem ser encontradas harmonicamente no organismo de indivíduos saudáveis, mas podem tornar-se patogênicas na presença de fatores predisponentes (CALDERONE e FONZI¹², 2001). Esses fatores podem ser locais, como abrasões, próteses mal adaptadas, xerostomia, uso de aparelho ortodôntico, tabagismo ou álcool, e sistêmicos quando relacionados a fatores hormonais como diabetes *mellitus* (MENEZES et al.⁶¹, 2007), período gestacional, idade avançada, e imunossupressão, principalmente em indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (MOREIRA et al.⁶³, 2001) e pacientes em tratamento radioterápico ou quimioterápico (JORGE et al.⁴⁵, 1997; GILFILLAN et al.³⁹, 1998).

A xerostomia é considerada um dos fatores predisponentes mais importantes à candidose bucal, por alterar o equilíbrio da microbiota, privar a mucosa da ação mecânica da saliva e dos constituintes salivares antimicrobianos, como anticorpos e enzimas (SANTOS et al.⁸⁸, 2002; THOMSON et al.¹⁰⁶, 2006; GRAND et al.⁴⁰, 2007).

Embora o agente etiológico das infecções fúngicas seja na maioria das vezes *C. albicans*, as espécies não-*albicans* também são comuns, sendo as mais consideradas em ordem decrescente de importância: *C. parapsilosis* (20-40% das infecções), *C. tropicalis* (10-30%), *C. krusei* (10-35%) e *C. glabrata* (5-40%). Atualmente algumas espécies são consideradas emergentes, como *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* (KRCMERY e BARNES⁵⁰, 2002; ELLEPOLA e SAMARANAYAKE³⁰, 1998; CASTRO et al.¹⁸, 2006).

Na atualidade, existe uma grande preocupação da classe odontológica com a prevenção de doenças infecciosas na cavidade bucal. Candidose é a mais comum infecção oportunista que envolve os tecidos da mucosa bucal causando manifestações superficiais ou sistêmicas, principalmente em indivíduos transplantados e portadores do HIV, sendo que 90% desses pacientes desenvolvem infecções bucais por *Candida* spp. (MAZA et al.⁵⁹, 2002; MELO et al.⁶⁰, 2004). O aumento de casos de infecções causadas por microrganismos do gênero *Candida* e conseqüentemente a utilização excessiva de antimicrobianos, tem ocasionado redução dos efeitos causados pelos antifúngicos e favorecido a resistência de algumas espécies a esses medicamentos (PINTO et al.⁷⁸, 2006; SILVA et al.⁹⁴, 2002; WHITE et al.¹¹⁸, 2002).

Tratamentos convencionais têm mostrado efeito mais fungistático do que fungicida (DONNELLY et al.²⁷, 2007), resultando em uma profilaxia inadequada e deficiente para o paciente, o que leva a um crescente interesse em novas terapias. O uso de medicamentos comumente utilizados tornou-se restrito e a necessidade de terapias

alternativas para o tratamento de candidoses bucais entre outras doenças locais se faz cada vez mais necessário (WILSON e MIA¹¹⁴, 1993; CAMINOS et al.¹³, 2006; DONNELLY et al.²⁷, 2007; DONNELLY et al.²⁶, 2008).

Terapia fotodinâmica (TFD) ou *Photodynamic Therapy* (PDT) é um novo conceito de terapia, designado como uma nova modalidade de tratamento do câncer e algumas doenças de origem microbiana (BONNET et al.⁹, 1989; MACHADO⁵⁴ 2000; SIBATA et al.⁹³, 2000; PERUSSI⁷⁷, 2007). O conceito de PDT começou com os estudos de Oscar Raab em 1900 sobre os efeitos da luz convencional e corantes em células de paramécio. Essa terapia é um tratamento clínico que utiliza um agente fotossensibilizante e um laser de baixa intensidade. A combinação fotossensibilizador mais luz forma a base da PDT ou TFD (SIMPLÍCIO et al.⁹⁵, 2002). O mecanismo de ação dessa terapia se dá quando o agente fotossensibilizante absorve os fótons de luz e seus elétrons passam a um estado excitado (NAVARRO et al.⁶⁶, 2005). Na presença de um substrato, como o oxigênio, o agente fotossensibilizante, ao retornar ao seu estado natural transfere energia ao substrato, formando espécies altamente reativas como o oxigênio singleto.

A terapia fotodinâmica tem sido utilizada no tratamento de doenças infecciosas de origem bacteriana, fúngica e algumas doenças causadas por vírus e parasitas (WAINWRIGHT¹¹¹, 1998; GRINHOLIC et al.⁴¹, 2007). Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos da terapia fotodinâmica sobre cepas de *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes com tuberculose pulmonar que faziam uso de antibióticos por tempo prolongado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* compreende aproximadamente 200 espécies de leveduras. São microrganismos eucarióticos e unicelulares, que reproduzem-se assexuadamente por brotamento (WEBB et al.¹¹², 1998). Grande parte das espécies pode apresentar um estágio hifal com produção de micélio verdadeiro ou pseudomicélio. Em condições especiais *in vitro* algumas espécies, como *C. albicans* pode produzir clamidoconídeos (MAZA et al.⁵⁹, 2002). O clamidoconídeo é uma estrutura de resistência formada por uma parede celular espessa e citoplasma condensado. É uma estrutura importante na identificação de algumas espécies, além do tubo germinativo (WELLMER¹¹³, 1997).

Espécies do gênero *Candida* encontram-se em uma variedade de nichos ecológicos no hospedeiro (SERRANO-GRANGER et al.⁹⁰, 2005). Algumas espécies estão associadas a diferentes condições patológicas humanas, como *C. albicans*, a mais comum relacionada a infecções oportunistas, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. rugosa* (HERNANDEZ et al.⁴⁴, 2004; CANNON et al.¹⁵, 1995; PATEL et al.⁷⁴, 2006).

C. albicans possui morfologia semelhante às outras espécies do gênero. Quando cultivadas em aerobiose com temperatura entre 20 a 38°C em ágar Sabouraud Dextrose, formam colônias que variam de cor branca a creme, superfície lisa ou rugosa, brilhante ou opaca (BEIGHTON et al.⁷, 1995). Caracteriza-se pela natureza dimórfica, incluindo forma hifal e leveduriforme (RAMAGE et al.⁸¹, 2001; GALE et al.³⁴, 1998). Essa mudança morfológica ocorre tanto *in vivo* quanto *in vitro* e constitui uma característica importante na colonização e infecção do

tecido hospedeiro (CALDERONE e FONZI¹², 2001; ALMEIDA e SCULLY¹, 2002).

A capacidade de produção de enzimas histolíticas como proteinases, lipases e fosfolipases, é considerada importante fator de virulência. As proteinases produzidas por leveduras desse gênero estão envolvidas no processo de invasão tecidual e hidrolisam ligações peptídicas. As fosfolipases hidrolisam fosfoglicerídeos, sendo importantes para a invasão tecidual e aderência desse microrganismo à mucosa bucal (SAMARANAYAKE et al.⁸⁷, 2001; SUNDSTROM¹⁰⁴, 2002; CANDIDO et al.¹⁴, 2000).

Os estados patológicos decorrentes da ação patogênica de fungos desse gênero são denominados candidíases ou candidoses. Modificações do estado de equilíbrio da microbiota bucal podem favorecer o desenvolvimento da ação patogênica de leveduras do gênero *Candida* (PIRES et al.⁷⁹, 2001). Desta forma, este fungo deixa sua condição de comensal e passa então a exercer ação parasitária, que se manifesta através de diversos quadros clínicos (MOREIRA et al.⁶³, 2001). Na cavidade bucal, leveduras do gênero *Candida* são amplamente encontradas e o dorso da língua é o reservatório primário, sendo as demais regiões secundárias (ARENDORF e WALKER⁴, 1980).

Vieira¹⁰ (2005) isolou leveduras do gênero *Candida* da cavidade bucal de crianças portadoras de Síndrome de Down e comparou com crianças que não apresentavam a síndrome. As crianças afetadas por essa cromossomopatia tinham mais candidose bucal e recidivas constantes. O autor sugere que as alterações anátomo-fisiológicas da boca das crianças portadoras da Síndrome de Down favorece a infecção por essas leveduras oportunistas.

Em 1997, foi descrita uma nova espécie do gênero *Candida* capaz de causar infecções. Essa espécie foi isolada da cavidade bucal de indivíduos portadores do HIV, recebendo então a denominação de *C. dubliniensis*. Apresenta as mesmas características fenotípicas de *C.*

albicans, podendo ser identificada apenas por técnicas de Biologia Molecular (GILFILLAN et al.³⁹,1998; ALVES et al.², 2000).

A segunda espécie do gênero mais comum na cavidade bucal é *C. glabrata*. Essa espécie não produz pseudo-hifas ou hifas verdadeiras, sendo freqüentemente isolada de pacientes usuários de prótese total. *C. tropicalis* é implicada em candidose invasiva e pode ser encontrada em cerca de 7% dos isolados bucais do gênero *Candida*. *C. parapsilosis* é habitante da pele e cavidade bucal, sendo considerada um patógeno emergente, especialmente nas candidoses em hospedeiros imunodeprimidos (PANAGODA e SAMARANAYAKE⁷³,1998; MOREIRA et al.⁶², 2002). É uma espécie importante em infecções hospitalares (KUHN et al.⁵¹, 2004).

C. krusei é isolada da cavidade bucal de indivíduos saudáveis e apresenta resistência ao fluconazol. *C. kefyr* é a única espécie de importância médica que fermenta e assimila lactose, sua presença está associada com estomatite por prótese total e infecções fúngicas disseminadas. *C. lipolytica* é considerada patógeno oportunista emergente, pode causar doenças em pacientes imunocomprometidos (KOGA-ITO et al.⁴⁸, 2006).

As espécies não-*albicans* como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* entre outras espécies podem causar candidoses bucal tanto quanto *C. albicans* (CANDIDO et al.¹⁴, 2000). Oliveira et al.⁷¹ (2006) averiguaram a diversidade das espécies do gênero *Candida* na cavidade bucal de 225 pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade de Campinas (UNICAMP), e concluíram que apesar da espécie predominante ser *C. albicans*, as espécies não-*albicans* mostraram-se em número significativo nestes pacientes.

As leveduras do gênero *Candida* são freqüentemente encontradas no biofilme dentário, possuindo também capacidade de aderência às superfícies acrílicas. *C. tropicalis* apresenta maior

hidrofobicidade e habilidade de aderência às superfícies acrílicas em relação à *C. albicans* (MINAGI et al.⁶⁴, 1985; BEIGHTON et al.⁷, 1995).

Candidemia ocorre principalmente em pacientes transplantados e hospitalizados que requerem tratamento em unidade de terapia intensiva, culminando para alta taxa de mortalidade (HARRIS et al.⁴³, 1999; SAFDAR et al.⁸⁵, 2000). A predominância de espécies não-*albicans* como *C. glabrata* e *C. krusei* nos últimos anos foi crescente em infecções sistêmicas, mas outras espécies como *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* também foram identificadas como agente etiológico dessas infecções (SHIVAPRAKASHA et al.⁹², 2007).

O uso de terapias antifúngicas apresenta limitações devido à toxicidade para o hospedeiro e desenvolvimento de resistência microbiana. Entretanto, vários antifúngicos possuem grande potencial terapêutico e são utilizados de forma tópica ou sistêmica (ODDS et al.⁷⁰, 2003).

A candidose orofaríngea é a infecção oportunista mais freqüente em pacientes imunossuprimidos e a resistência aos antimicrobianos nestes pacientes é comum, principalmente aos antifúngicos amplamente utilizados. Segundo Batista et al.⁶ (1999), a anfotericina-B é um dos antifúngicos mais utilizados sistemicamente para o tratamento da maioria das infecções fúngicas invasivas. KOGA-ITO et al.⁴⁹ (2004), verificaram a suscetibilidade aos antifúngicos de várias cepas de leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes com periodontite crônica. De acordo com esse autor, *C. glabrata* foi resistente ao cetoconazol e outras espécies mostraram-se resistentes a anfotericina B e miconazol. O fluconazol foi o antifúngico mais eficaz contra as várias espécies de *Candida* estudada.

Algumas espécies podem ser naturalmente resistentes ou pouco suscetíveis a um agente antifúngico. *C. krusei* é resistente ao fluconazol e *C. glabrata* é suscetível, mas somente quando administrado alta dose da medicação. Das espécies não-*albicans*, *C. tropicalis*

representa a terceira espécie freqüentemente mais isolada e mostra-se suscetível para antifúngicos polienos e azóis (fluconazol) (VANDEPUTTE et al.¹⁰⁹, 2005; SIMS et al.⁹⁶, 2006).

Os mecanismos pelos quais essas leveduras desenvolvem resistência aos antifúngicos ainda não é muito compreendido (BAILLE e DOUGLAS⁵, 1998). Uma possibilidade da resistência microbiana está relacionada com a produção de biofilme produzida por esses microrganismos (PFALLER et al.⁷⁵, 1996). Drogas antimicrobianas afetam a biossíntese ou expressão de componentes da superfície celular, podendo interferir na capacidade de aderência, fato relevante no controle da colonização e posteriormente da infecção bucal (SEGAL et al.⁸⁹, 1997).

Pacientes idosos portadores de prótese total são freqüentemente acometidos por infecções oportunistas causadas por fungos (LEMOS et al.⁵³, 2003). De acordo com Ellepola e Samaranayake³⁰ (1998), 60% dos idosos sofrem de estomatite induzida por microrganismos do gênero *Candida*. A nistatina e anfotericina-B são os antifúngicos mais utilizados, topicamente ou aplicados diretamente na resina das próteses, antes da sua inserção.

Panackal et al.⁷² (2006) avaliou sete casos de infecção invasiva por *C. glabrata* durante tratamento de terapia antifúngica. Os autores utilizaram dois antifúngicos: fluconazol e uma nova droga mais eficiente, voriconazol. O estudo demonstrou que *C. glabrata* exibiu resistência às drogas utilizadas, mesmo quando administradas simultaneamente.

Navas⁶⁷ (2007) coletou amostras de enxágües bucais de 38 pacientes portadores de hanseníase multibacilar, 25 destes eram positivos para leveduras do gênero *Candida*. O autor testou quatro antifúngicos, incluindo anfotericina-B, 5-fluorocitocina, fluconazol e citoconazol, sobre as cepas isoladas. Os resultados demonstraram que todos as cepas foram sensíveis aos antifúngicos testados, exceto uma cepa de *C. tropicalis*, que mostrou-se resistente a anfotericina-B.

2.2 Laser

A palavra laser advém da abreviação *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (SULEWSKI¹⁰³, 2000). O laser é um equipamento composto por substâncias denominadas de meio ativo (gás, sólidos e líquidos), que quando excitadas por uma fonte de energia geram luz. São definidos como sendo ondas eletromagnéticas não ionizantes com características especiais, (CATÃO¹⁹, 2004). Os lasers são classificados em duas famílias conforme sua intensidade e a capacidade de interação com os tecidos: laser em baixa intensidade de energia (*LILT - Low Intensity Level Treatment*); também chamados de terapêuticos e lasers em alta intensidade de energia (*HILT - High Intensity Laser Treatment*) conhecidos como cirúrgicos (NEVES et al.⁶⁸, 2005).

Os lasers em alta intensidade interagem com os tecidos por reações fototérmicas, nas quais a energia da luz absorvida pelos tecidos é transformada em calor. Os de baixa potência são baseados em efeitos onde a radiação absorvida desencadeará reações fotoquímicas ou fotofísicas intracelulares ou teciduais, não ocorrendo aumento de temperatura (NAVARRO et al.⁶⁶, 2005; KARU⁴⁷, 1987). O comprimento de onda dos lasers pode cobrir do infravermelho ao ultravioleta, cada tipo emite um determinado comprimento de onda (ROSA et al.⁸³, 2005; MELO et al.⁶⁰, 2004).

Os lasers em baixa intensidade também denominados laser mole, laser frio, laser terapêutico ou *soft-laser*, emitem radiação sem potencial destrutivo e podem induzir uma ação fotoquímica de analgesia, anti-inflamatória e de biomodulação, caracterizados por comprimento de onda no espectro eletromagnético geralmente do ultravioleta ao infravermelho, variando de 630 a 940 nm (KURACHI et al.⁵², 2002). Entre os lasers de baixa intensidade encontram-se: laser Hélio-Neônio (He-Ne),

laser diodo Arseneto de Gálio (AsGa) e laser Arseneto de Gálio e Alumínio-(AsGaAl) (NEVES et al.⁶⁸, 2005).

O laser de hélio-neônio é composto por uma mistura de gases nobres, com o predomínio do hélio (90%) em relação ao neônio (10%), possibilitando uma radiação visível de coloração vermelha e com comprimento de onda de 632,8 nm. Esse tipo de laser tem-se mostrado com grande poder terapêutico, tanto para lesões superficiais como em lesões profundas. O laser de diodo é uma radiação obtida a partir da estimulação de um diodo semiconductor formado por cristais de arseneto de gálio ou arseneto de gálio e alumínio ou ainda fosfeto de índio-gálio-alumínio. Estes tipos de laser apresentam potencial terapêutico mais destacado em lesões superficiais como lesões dermatológicas e odontológicas. Quando se incide a radiação eletromagnética sobre qualquer substância, ocorrem quatro fenômenos: absorção, espalhamento, reflexão e transmissão; uma parte se reflete e outra é absorvida, tanto pela água no tecido ou por algum cromóforo absorvedor, como a hemoglobina e melanina (GENOVESE e PROKOPOWITSCH³⁸, 2007).

De acordo com o comprimento de onda, os lasers apresentam maior ou menor afinidade pelos cromóforos, em baixa intensidade a radiação absorvida desencadeará efeitos fotoquímicos e fotofísicos (CHAN e LAI²¹, 2003). Tanto os lasers de alta como de baixa intensidade podem ter ação antimicrobiana, entretanto os de alta intensidade matam microrganismos por aumento de temperatura, enquanto os de baixa potência podem ter efeito antimicrobiano quando associados a corantes ou fotossensibilizadores que absorvem a radiação emitida e seus efeitos térmicos não superam 0,1 a 0,5°C (MATEOS⁵⁶, 2005; GARCEZ et al.³⁶, 2003).

2.3 Fotossensibilizador

Um agente fotossensibilizante é definido como uma substância que induz sensibilidade luminosa a processos químicos e físicos. Estes componentes acumulam-se no alvo celular e absorvem energia diretamente de uma fonte de luz, gerando então uma reação fotodinâmica geralmente mediada por oxigênio singlete (MACHADO⁵⁵, 2006). Quando o corante ou fotossensibilizador é irradiado com um comprimento de onda adequado, é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio, uma dessas espécies é o oxigênio singlete responsável pela necrose celular (COUTINO et al.²³, 2007). Considerando que o principal agente ativador no processo fotodinâmico é o corante fotossensível, este deve possuir várias propriedades físico-químicas, farmacológicas e fotobiológicas que o qualifiquem como bom agente para a terapia, isto é, ter alta eficiência e ao mesmo tempo apresentar mínimos efeitos colaterais (SIMPLÍCIO et al.⁹⁵, 2002).

As principais características necessárias a um fármaco em terapia fotodinâmica oncológica são: alta seletividade (afinidade e penetração no tecido alvo); baixa toxicidade no escuro; facilidade de obtenção e simplicidade na formulação; alta estabilidade; eliminação favorável. Com relação às principais características fotofísicas destaca-se a alta absorção da luz na região de 600 a 800 nm na PDT utilizada em dermatologia e odontologia (SOARES⁹⁷, 2006).

Na aplicação da terapia fotodinâmica é importante observar a concentração da droga utilizada, pois deve ter um mínimo de toxicidade para o paciente e uma boa absorção da luz que será emitida por um laser de baixa intensidade, essa combinação causa uma liberação de oxigênio reativo causando reações oxidativas e morte celular (WAINWRIGHT¹¹¹, 1998).

A primeira geração de fotossensibilizadores, baseada em misturas de derivados porfirínicos, mostrou-se eficiente no tratamento de

tumores de diversas naturezas, malignos ou não (WAINWRIGHT¹¹¹, 1998; TITÃ¹⁰⁷, 2001; RIBEIRO et al.⁸², 2007). Essa terapia pode induzir a morte celular por necrose e apoptose, ambos por procedimentos *in vitro* e *in vivo*, mas os fatores que determinam esses processos não são completamente compreendidos (FABRIS et al.³², 2001; DELLINGER²⁴, 1996).

A partir da década de setenta na PDT oncológica, várias preparações de derivados porfirínicos começaram a ser testadas, culminando para o Photofrin (DOUGHERT²⁸, 1987). A aprovação do Photofrin foi dificultada inicialmente, por se tratar de uma mistura de diversos componentes, entretanto de acordo com a alta incorporação no tumor, aliada à baixa ocorrência de efeitos colaterais, foi aceito como fotossensibilizador para ser utilizado em terapia fotodinâmica (STERNBERG¹⁰², 1998; MACHADO⁵⁴, 2000).

Novas drogas foram sendo desenvolvidas e melhoradas a partir da década de oitenta e aplicadas na terapia contra o câncer, sendo duas famílias de corantes os mais extensivamente estudados, as porfirinas e ftalocianinas. A primeira geração de corantes, derivados porfirínicos, mostrou-se eficiente no tratamento de neoplasias, entretanto uma segunda geração de fototerapêuticos foram desenvolvidas, como as ftalocianinas e as clorinas que possuem elevada absorvidade e doses menores de administração que o usual (MACHADO⁵⁴, 2000; SETÚBAL⁹¹, 2007).

As porfirinas constituem uma classe muito importante de moléculas que estão presentes em muitos sistemas biológicos, como nos citocromos e hemoglobinas (EDELL e CORTESE²⁹, 1992). Outros fotossensibilizadores, como o azul de metileno e azuleno, tem-se mostrado efetivos quando aplicados em microrganismos patogênicos, dando início à uma terapia capaz de tratar além de neoplasias, doenças infecciosas de origem bacteriana ou fúngica.

O azul de metileno é um corante fenotiazínico, semelhante ao azul de toluidina, possui absorção em torno de 600 a 700nm com pico de absorção em 660 nm. Ambos são usados em baixas concentrações, normalmente sem causar toxicidade em tecidos humanos. Na terapia fotodinâmica, foi demonstrado que pequenas doses e comprimento de onda adequados são suficientes para inativar microrganismos. A inativação efetiva do HIV foi obtida usando-se 1 µg/mL de azul de metileno e 10,5 mW/cm² de luz vermelho visível de laser. Esse protocolo de terapia fotodinâmica levou a destruição do envelope viral (WAINWRIGHT¹¹¹, 1998).

Wilson et al.¹¹⁵ (1993) aplicaram PDT em patógenos encontrados na cavidade bucal, microrganismos implicados na causa da cárie dental tal como *Streptococcus* spp., foram erradicados usando azul de metileno como fotossensibilizador.

Os corantes fenotiazínicos, em determinadas concentrações, apresentam potencial citotóxico às células bacterianas e células humanas, devendo ser utilizados em concentrações baixas, diminuindo sua absorção pela luz laser e sua eficácia na redução microbiana (WAINWRIGHT¹¹¹ 1998). Navarro et al.⁶⁶ (2005) relataram que as concentrações indicadas para os corantes fenotiazínicos não devem ultrapassar 0,1% pois acima desta concentração, esses corantes tornam-se tóxicos e provocam o manchamento da dentina, tornando o tratamento inviável quanto à estética.

Entre os corantes fitoterápicos, o azuleno mostrou-se eficiente na redução bacteriana. O azuleno é um corante extraído da camomila (*Chamomilla recutia*), muito utilizado no preparo de loções e shampoos (GARCEZ³⁷, 2002). Garcez et al.³⁶ (2003) observaram que o azuleno, em forma líquida ou em gel, apresentou manchamento do esmalte e dentina somente na concentração de 25%. Em concentrações inferiores não ocorreu manchamento da estrutura dentária.

2.4 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT)

A terapia fotodinâmica (PDT- do inglês *Photodynamic Therapy*) apresenta grande eficácia na indução de morte celular em procedimentos *in vitro*, e vêm sendo aplicada no controle de microrganismos patogênicos. É um novo conceito de terapia utilizado para tratar doenças infecciosas, sendo aprovada em muitos países para tratar neoplasias de pulmão, esôfago, bexiga e pele (SIBATA et al.⁹³, 2000). Embora a utilização da PDT pareça recente, os primeiros experimentos datam de cem anos atrás, quando Raab observou que a exposição ao corante acridina e luz podiam ser letais para paramécios.

Infecções localizadas causadas por fungos ou bactérias podem ser tratadas pela PDT. Na odontologia, diversos procedimentos com o uso do laser são realizados visando a ação bactericida no tratamento de cáries, tratamentos endodônticos e infecções localizadas de microbiota conhecida.

Sarkar e Wilson⁸⁶ (1993) testaram amostras de biofilme dentário subgingival de pacientes com periodontite crônica utilizando o laser HeNe com 7,3 mW e azul de toluidina como fotossensibilizador. A combinação laser e corante reduziu significativamente a viabilidade de bactérias aeróbias e anaeróbias, sendo 94,2% para estreptococos. Os autores perceberam que a redução não foi viável quando o corante foi utilizado sem estar associado ao laser e concluíram que o azul de toluidina é um fotossensibilizador letal e efetivo em bactérias da cavidade bucal.

Em 1994 Burns et al.¹¹, aplicaram laser arseneto de gálio e alumínio e corante fitalocianina em algumas espécies de bactérias cariogênicas tal como *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus*. Os autores relataram que o corante isolado não demonstrou efeito satisfatório na viabilidade dos microrganismos tratados, mas quando o laser foi aplicado associado com o corante, os

microrganismos foram suscetíveis. A fitalocianina juntamente com o laser mostrou-se efetiva na eliminação de bactérias de lesões cariogênicas.

A atividade antimicrobiana do corante azul de toluidina combinado ao laser de diodo com 630 nm em bactérias formadoras de biofilme dentário, foi verificada por Zanin et al.¹²⁰ (2006). Houve significativa redução de células viáveis quando expostas ao corante e luz (95% de redução), porém observou que o corante utilizado isoladamente não apresentou efetividade antimicrobiana.

Kcrrmery⁵⁰ (2006) relatou que infecções na boca como cáries, pulpites, doenças periodontais e infecções das mucosas como úlceras podem ser tratadas com a PDT resultando em prognóstico satisfatório. Muitos microrganismos responsáveis por tais patologias são suscetíveis quando expostos a essa terapia. O uso adequado do corante e dose de luz pode erradicar todos os microrganismos de uma determinada região, mas na cavidade bucal onde há uma microbiota nativa, tal erradicação pode ser um problema em potencial em função dos microrganismos oportunista.

Doenças periodontais são causadas por patógenos encontrados nos sulcos gengivais, tal como bactérias Gram-negativas anaeróbias (*Phorphyromonas gingivalis*), ocasionando bolsas periodontais e comprometimento dos dentes. O tratamento para esse tipo de infecção consiste na administração de antibióticos, mudança de hábitos por parte do paciente e remoção do biofilme e cálculo. A ocorrência de resistência microbiana à antibióticoterapia não é isolada, mas é fator comum que pode estabelecer uma terapia inadequada e ineficiente. A PDT é uma terapia que trata infecções locais como doença periodontal (WILSON e MIA et al.¹¹⁵, 1993. De acordo com Rovaldi et al.⁸⁴ (2000), as porfirinas e clorinas reduzem significativamente bactérias responsáveis por doenças periodontais, importante procedimento para regressão da infecção.

Embleton et al.³¹ (2005) relataram que houve aumento na resistência de algumas bactérias como *S. aureus* à vários antibióticos,

incluindo a meticilina e vancomicina e estes microrganismos resistentes podem desenvolver resistência a novos agentes antimicrobianos. Os autores referem-se também em seu estudo, aos benefícios da PDT no que diz respeito ao gerenciamento dos efeitos colaterais no tecido do hospedeiro.

Em 2006, Soukos et al.⁹⁸ analisaram os efeitos da terapia fotodinâmica em patógenos endodônticos, como *Enterococcus faecalis*. Os microrganismos foram fotossensibilizados com azul de metileno e expostos a radiação por 5 min de luz vermelho visível com 665 nm e densidade de energia de 35 J/cm². Os autores concluíram que a PDT pode ser um procedimento complementar para eliminar microrganismos residuais no canal radicular após tratamento endodôntico convencional.

Wood et al.¹¹⁷ (2006) compararam a eficácia do corante eritrosina, azul de metileno e photofrin em biofilme formado por *Streptococcus mutans*. Os corantes foram utilizados e irradiados por 15 min com 400 W de energia. A eritrosina foi mais efetiva do que o photofrin, que por sua vez foi mais efetivo que o azul de metileno. Os autores concluíram que a PDT utilizando a eritrosina como fotossensibilizador é um tratamento eficaz para prevenir a formação do biofilme dentário.

Alguns corantes como azul de metileno e azul de toluidina são utilizados para inativar vários microrganismos patogênicos, incluindo vírus, fungos e bactérias, sendo o azul de metileno mais efetivo em vírus e o azul de toluidina mais efetivo na inativação de leveduras, organismos do gênero *Candida* e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (USACHEVA et al.¹⁰⁸, 2001).

Prates et al.⁷⁶ 2007 estudaram o corante verde de malaquita combinado à luz vermelho visível de laser de baixa intensidade sobre *Actinomyces actinomycetemcomitans*, microrganismo encontrado no biofilme dentário. Os autores relataram que a utilização do laser ou

corante isolados não foi capaz de eliminar o microrganismo em questão, mas quando associados a bactéria foi eliminada.

O azuleno ou camazuleno, é um corante extraído da camomila, formado por anéis aromáticos. De acordo com Garcez³⁷ (2002), esse corante mostrou-se eficiente na redução bacteriana, tanto em solução aquosa a 0,1% como a 25% associado a pasta endo PTC. O azuleno foi o corante que melhor absorveu o comprimento de onda de 685 nm, superior aos corantes azul de toluidina e azul de metileno, citados na literatura.

Jori et al.⁴⁶ (2006) relataram o uso da PDT como sendo uma modalidade emergente de tratamento para infecções localizadas, utilizada para inativar leveduras e fungos. O Photofrin acumula-se nas células de leveduras como *C. albicans* e promove extensa inativação destes microrganismos.

Os efeitos da PDT sobre células fúngicas mostrou-se como uma alternativa viável para tratar micoses oportunistas principalmente em portadores do HIV. Segundo Bliss et al.⁸ (1998), a resistência aos antifúngicos tradicionais é crescente em muitas espécies do gênero *Candida*. Algumas cepas dessas leveduras, como *C. krusei*, são resistentes às drogas comumente usadas como o fluconazol, tornando as terapias antifúngicas inadequadas.

Wilson e Mia¹¹⁴ (1993) analisaram *in vitro* a efetividade da PDT na sensibilização de *C. albicans*. Esses autores realizaram irradiações de suspensões de *C. albicans* com laser Hélio-Neônio (66,36J/cm²), tendo como fotossensibilizadores azul de toluidina, tionina e cristal de violeta. Os resultados demonstraram reduções significativas nas unidades formadoras de colônias (UFC/mL) após a PDT, sugerindo a viabilidade de seu uso nas lesões de candidose bucal.

Chabrier-Roselló et al.²⁰ (2005) estudaram os efeitos da terapia fotodinâmica em infecções mucocutâneas e cutâneas causadas

por *C. albicans*, e observaram suscetibilidade desse microrganismo ao Photofrin quando utilizado como fotossensibilizador na PDT.

Souza et al.¹⁰¹ (2006) sensibilizaram várias espécies de *Candida* com azul de metileno e encontraram redução de 88,6% para *C. albicans*, 84,8% para *C. dublinienses*, 91,6% para *C. krusei* e 82,3% para *C. tropicalis*. Os autores relataram que a utilização isolada do laser ou do corante não reduziu significativamente o número de células viáveis, exceto para *Candida tropicalis*.

Teichert et al.¹⁰⁵ (2002) avaliaram a eficácia do fotossensibilizador azul de metileno para tratar candidose bucal utilizando 75 ratos como modelo experimental. *C. albicans* foi inoculada nos animais imunossuprimidos. Os resultados indicaram que o corante azul de metileno pode ser potencialmente viável para tratar infecções bucais em pacientes imunodeprimidos.

Miyabe et al.⁶⁵ (2007) aplicaram terapia fotodinâmica em 20 cepas de *Staphylococcus* isoladas da cavidade bucal de pacientes submetidos à antibioticoterapia prolongada. Os autores utilizaram o AM como fotossensibilizador e laser de Arseneto de Gálio Alumínio. Em cada cepa de microrganismo foram realizadas cinco condições experimentais: laser e fotossensibilizador (L+F+), laser sem fotossensibilizador (L+F-), apenas fotossensibilizador (L-F+), solução fisiológica como controle (L-F-) e tratamento com antibiótico ciprofloxacina. O grupo L+F+ apresentou redução significativa em relação ao grupo controle L-F- para as 20 cepas analisadas. O percentual de redução variou de 99,97 a 100%. O uso de antibiótico causou eliminação em 19 cepas de *Staphylococcus*. O AM também reduziu o número de microrganismos, entretanto o laser isolado não demonstrou atividade fungicida.

Faria et al.³³ (2007) também estudaram os efeitos da terapia fotodinâmica na candidose bucal em ratos. A candidose experimental foi induzida por inoculações orais de *C. albicans*. Após 7 dias, a lesão de candidose formada no dorso da língua foi tratada com

terapia fotodinâmica em uma única sessão, utilizando-se azul de metileno como fotossensibilizador. Os grupos que receberam terapia fotodinâmica (L+F+) exibiram menor alteração do epitélio e menor resposta inflamatória crônica em relação ao grupo Controle (L-F-). O grupo tratado apenas com laser (L+F-) apresentou lesões epiteliais e resposta inflamatória crônica mais intensas do que os demais grupos. O grupo tratado apenas com fotossensibilizador (L-F+) demonstrou lesões teciduais semelhantes ao grupo Controle (L-F-).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica, utilizando-se os corantes azul de metileno e azuleno associados ao laser em baixa intensidade, sobre cepas de *Candida* isoladas da cavidade bucal humana.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas de *Candida*

Esse trabalho foi realizado de acordo com os princípios éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o protocolo 05/2007 (Anexo A).

Foram utilizadas 20 cepas de *Candida*, sendo 5 *C. albicans*, 4 *C. tropicalis*, 4 *C. glabrata*, 2 *C. parapsilosis*, 2 *C. kefyr*, 1 *C. krusei*, 1 *C. lipolytica* e 1 *C. stellatoidea*. Cada cepa foi submetida a diferentes condições experimentais conforme Quadro 1. Foram realizados 36 ensaios a partir de cada cepa de *Candida*, totalizando 840 ensaios.

Quadro 1 - Número de ensaios nos diferentes grupos experimentais para cada cepa clínica de *Candida* a ser estudada.

Condições experimentais	Número de ensaios
Laser + Azul de Metileno (L+AM+)	6
Laser + Azuleno (L+AZ)	6
Laser (L+F-)	6
Azul de metileno (L-F+)	6
Azuleno (L-F+)	6
Solução fisiológica (L-F-)	6
Total para cada cepa	36

As cepas de *Candida* a serem analisadas foram provenientes do laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, e foram isoladas de pacientes

submetidos ao tratamento com antibióticos por um período superior a 45 dias para o tratamento da tuberculose pulmonar (Querido⁸⁰, 2006).

4.2 Preparo da suspensão de *Candida*

Foi preparada suspensão de cada cepa de *Candida* contendo 10^6 células/mL, a qual foi semeada em ágar *Sabouraud* dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubada a 37°C por 48 horas. A seguir, o microrganismo foi semeado em caldo *Sabouraud* e incubado a 37°C por 16 horas (fase exponencial do crescimento microbiano).

O crescimento foi centrifugado a 1300 Xg durante 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O sedimento foi suspenso em 5 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,85%). Esse procedimento foi repetido e a contagem do número de células da suspensão foi realizada por meio de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,284.

4.3 Fotossensibilizador

Para a sensibilização de *Candida* foram utilizados como fotossensibilizadores os corantes azul de metileno (Labsynth, Diadema, São Paulo) a 0,1% e azuleno (Becker, São José dos Campos, São Paulo) a 1%. As soluções foram filtradas em membrana (Spritzen-Filter, São Paulo, SP) com poros de diâmetro de 0,22 µm.

4.4 Laser em baixa intensidade

A fonte de luz usada foi um laser de Arseneto de Gálio Alumínio (Easy Laser, Clean Line, Taubaté, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível), correspondente à faixa de comprimento de alta absorção por esses fotossensibilizadores. A aplicação do laser foi realizada por contato da ponta ativa do laser com o fundo do poço da placa de microtitulação. Os parâmetros do laser utilizado foram os seguintes:

- Potência = 35 mW
- Energia = 10 J
- Tempo de exposição = 4,45 min
- Área irradiada = 0,38 cm²
- Densidade de energia = 26,31 J/cm²

4.5 Fotossensibilização *in vitro*

Em placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano, esterilizadas e com tampa (TPP, Trasadingen, Suíça) foi adicionado 100 µL de suspensão de *Candida* e 100 µL do fotossensibilizador ou de solução fisiológica (NaCl a 0,85%). A seguir, a placa contendo as amostras foi agitada durante 5 min em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Após esse período, o conteúdo de cada poço foi irradiado (Figuras 1 e 2) de acordo com os grupos previamente descritos (Quadro 1). A irradiação das amostras foi realizada em condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Após a irradiação, a partir de cada amostra, foram realizadas diluições seriadas de 10⁻² e 10⁻³ e alíquotas de 100 µL das diluições foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar *Sabouraud* dextrose (Difco, Detroit, USA). Após incubação a 37° C por 48 horas, foi feita a contagem das unidades formadora de colônias (UFC/mL) e os dados foram submetidos à análise estatística.

Durante todo o experimento foi mantido ambiente escuro e utilizado um anteparo negro fosco sobre a placa de diluição, evitando-se espalhamento de luz.



Figura 1 - Laser de baixa intensidade



Figura 2 - Suporte para realização da terapia fotodinâmica *in vitro*

4.6 Análise estatística

Os dados de UFC/mL foram transformados em logaritmo e submetidos à Análise de variância e Teste de Tukey. A análise estatística foi realizada no Programa Minitab, considerado-se nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

As médias de UFC/mL (Log) obtidas em cada cepa estudada estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Médias de UFC/mL (Log) obtidas nos grupos experimentais para as 20 cepas de *Candida* estudadas (n=6)

Espécie	L+AM+	L+AZ+	L+F-	L-AM+	L-AZ+	L-F-
<i>C. albicans</i>	5,20	5,38	5,27	5,80	5,68	5,86
	5,58	5,81	5,64	5,64	5,88	6,04
	5,10	5,19	4,95	5,72	5,64	5,65
	4,95	5,25	5,57	5,73	5,70	5,64
	4,54	4,90	4,86	5,53	5,56	5,38
<i>C. tropicalis</i>	4,52	4,78	4,53	4,89	4,75	5,00
	5,07	5,29	4,96	5,16	5,21	5,30
	5,18	5,22	4,96	5,22	5,50	5,32
	5,46	5,44	5,32	5,59	5,45	5,54
<i>C. glabrata</i>	5,68	5,79	4,72	6,00	6,01	5,82
	5,92	6,06	5,94	5,99	6,10	6,05
	5,96	6,00	5,96	6,19	6,00	5,98
	5,66	5,57	5,14	5,85	5,84	5,77
<i>C. parapsilosis</i>	5,45	5,83	5,09	5,89	5,91	5,94
	5,06	5,74	5,13	5,74	5,88	5,92
<i>C. kefyr</i>	5,84	5,92	6,01	6,06	6,23	6,25
	5,05	5,37	5,00	5,63	5,72	5,80
<i>C. stellatoidea</i>	5,64	5,87	5,80	5,96	6,03	5,96
<i>C. krusei</i>	5,09	5,33	4,92	5,54	5,47	5,48
<i>C. lipolytica</i>	5,20	5,35	4,62	5,52	5,56	5,61

Foi realizada a estatística descritiva para cada espécie de *Candida* analisada. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 3 e 4.

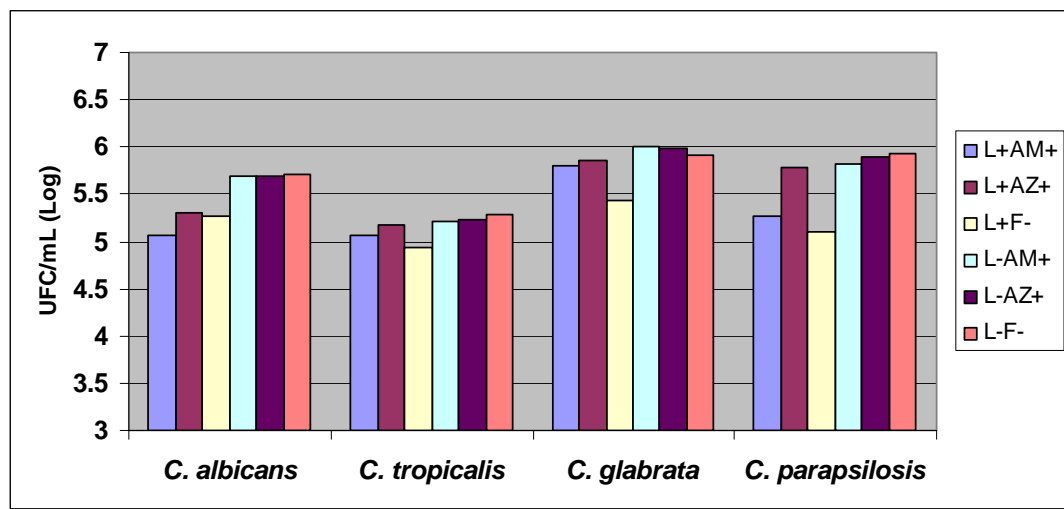


FIGURA 3 - Médias de UFC/mL (Log) para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* de acordo com os seguintes grupos experimentais: laser e azul de metileno (L+AM+), laser e azuleno (L+AZ+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-AM+), azuleno (L-AZ+) e apenas solução fisiológica (L-F-)

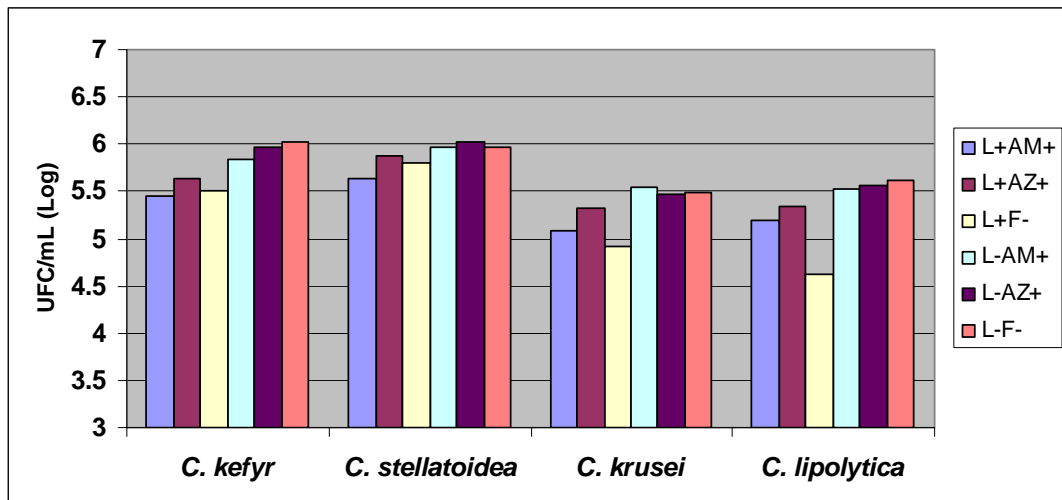


FIGURA 4 - Médias de UFC/mL (Log) para *C. kefyr*, *C. stellatoidea*, *C. krusei* e *C. lipolytica* de acordo com os seguintes grupos experimentais: laser e azul de metileno (L+AM+), laser e azuleno (L+AZ+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-AM+), azuleno (L-AZ+) e apenas solução fisiológica (L-F-)

Como todas as espécies de *Candida* exibiram o mesmo padrão de resultados nos diferentes grupos experimentais, foi realizada a análise de variância e teste de Tuckey sobre as 20 cepas de *Candida* estudadas neste trabalho (Tabela 2).

Tabela 2 - Estatística descritiva e teste de Tukey dos dados de UFC/mL (Log) obtidos nas 20 cepas de *Candida* de acordo com os grupos tratados com: laser e azul de metileno (L+AM+), laser e azuleno (L+AZ+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-AM+), azuleno (L-AZ+) e apenas solução fisiológica (L-F-).

Valores	L+AM+	L+AZ+	L+F-	L-AM+	L-AZ+	L-F-
Média	5,30	5,50	5,22	5,68	5,70	5,71
DP*	0,41	0,36	0,45	0,32	0,34	0,31
Mínimo	4,52	4,78	4,53	4,89	4,75	5,00
Mediana	5,20	5,41	5,11	5,72	5,71	5,78
Máximo	5,96	6,06	6,01	6,19	6,23	6,25
GH**	C	B	C	A	A	A

*Desvio-padrão; **Grupos homogêneos: letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos L+AM+, L+AZ+, L+F-, L-AM+, L-AZ+ e L-F- (teste de Tukey, $p < 0,05$)

Observa-se na Tabela 2 que todos os grupos tratados com laser (L+AM+, L+AZ+ e L+F-) apresentaram médias de UFC/mL (Log) inferiores aos grupos sem laser (L-AM+, L-AZ+ e L-F-), sugerindo que o uso do laser, independente de estar associado ou não a um fotossensibilizador, provocou redução microbiana.

O grupo com terapia fotodinâmica utilizando azul de metileno (L+AM+) apresentou média de UFC/ml (log) semelhante ao grupo (L+F-). No grupo de terapia fotodinâmica com azuleno (L+AZ+) (log) foi superior ao grupo (L+F-).

Esses dados demonstraram que a terapia fotodinâmica, utilizando os fotossensibilizadores azul de metileno e azuleno, não apresentou efeito sobre as cepas clínicas de *Candida* estudadas.

Os resultados obtidos nos grupos L-AM+ e L-AZ+ foram semelhantes ao grupo controle (L-F-), indicando que o uso isolado do fotossensibilizador (azul de metileno ou azuleno) não apresentou toxicidade para as cepas clínicas de *Candida*.

O crescimento das colônias de *Candida* nos diferentes grupos experimentais está ilustrado na Figura 5.

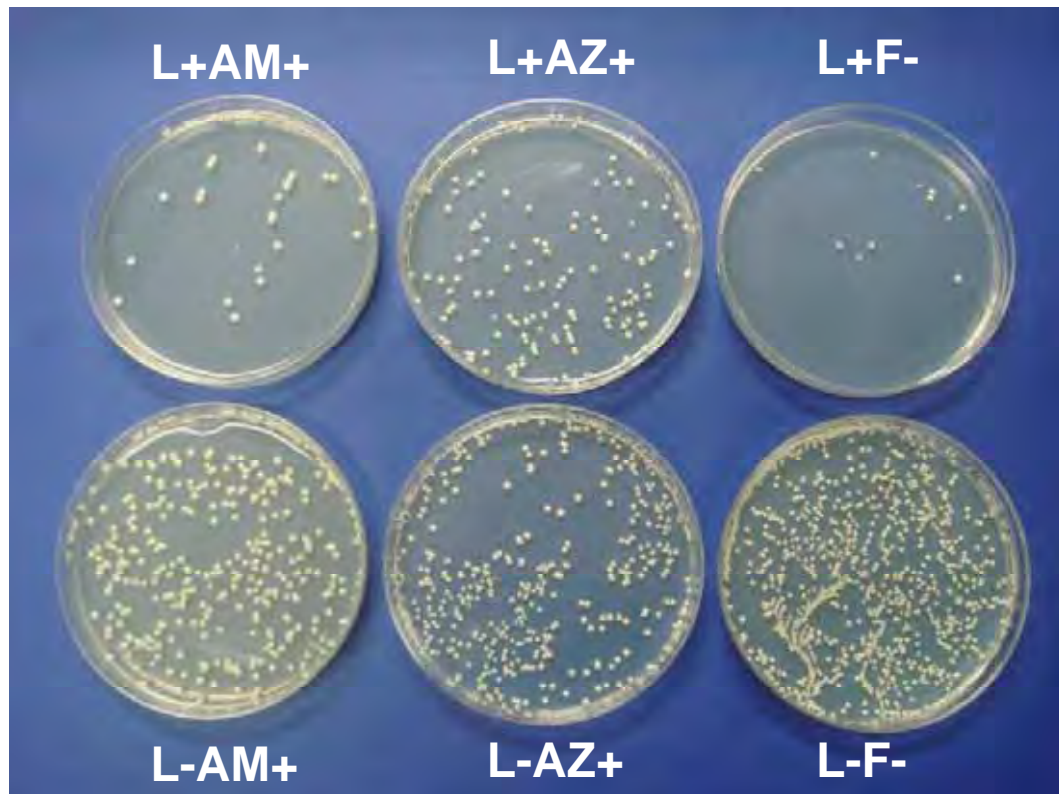


FIGURA 5 - Colônias de *C. albicans* em ágar Sabouraud dextrose nos seguintes grupos experimentais: laser e azul de metileno (L+AM+), laser e azuleno (L+AZ+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-AM+), azuleno (L-AZ+) e apenas solução fisiológica (L-F-)

Os resultados obtidos na estatística descritiva realizada para cada cepa de *Candida* estão apresentados nas Tabelas 3 - 10 (Anexo B).

6 DISCUSSÃO

A ocorrência de infecções causadas por fungos na mucosa bucal aumentou consideravelmente nos últimos anos, este fato deve-se ao uso indiscriminado de antibióticos, tratamento quimioterápico para neoplasias, uso de drogas imunossupressoras que influenciam na microbiota bucal e desordens do sistema imunológico. A utilização excessiva de antibióticos é responsável por um desequilíbrio na microbiota bucal, favorecendo a ocorrência de fungos oportunistas na cavidade bucal (SANTOS et al.⁸⁸, 2002; DONNELLY²⁶, 2008).

Diferentes tipos de infecções fúngicas, especialmente invasivas, tem sido um importante problema de saúde pública nas últimas décadas (CARRILLO-MUÑOZ et al.¹⁶, 2006). *Candida albicans* é o fungo oportunista mais freqüentemente encontrado em seres humanos (Baillie et al.⁵, 1998), embora as infecções por espécies *não-albicans* estejam se tornando cada vez mais freqüentes (KRCMERY e BARNES⁵⁰, 2002).

O uso constante de antifúngicos tópicos e sistêmicos principalmente em pacientes com infecções recidivantes é responsável por um aumento alarmante de resistência microbiana (CARRILLO-MUÑOZ et al.¹⁷, 1997, PINTO et al.⁷⁸, 2006). Assim, novas terapias para as infecções fúngicas precisam ser desenvolvidas. A terapia fotodinâmica baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um corante sensível a luz, seguida por irradiação de luz em baixa intensidade (GAD et al.³³, 2004). Essa nova modalidade de terapia tem sido aprovada e utilizada em diversos países para o tratamento de neoplasias e outras doenças (DOUGHERT²⁸, 1998), sendo também efetiva em destruir patógenos oportunistas sem causar efeito colateral ou tóxico para o hospedeiro.

Querido⁸⁰ (2006) analisou a microbiota bucal de 50 indivíduos diagnosticados com tuberculose pulmonar que estavam sendo

submetidos à antibioticoterapia por tempo prolongado, e verificaram que 72% dos indivíduos eram portadores de leveduras do gênero *Candida*. Neste grupo de pacientes, foi observado uma grande diversidade de espécies de *Candida*. No presente estudo, as espécies *albicans* e não *albicans* isoladas da cavidade bucal desses pacientes foram testadas quanto a sensibilidade à terapia fotodinâmica utilizando-se os corantes azul de metileno e azuleno.

Foram analisadas 20 cepas de *Candida* pertencentes a 8 espécies diferentes, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lipolytica* e *C. stellatoidea*. Em todas as espécies estudadas, os grupos que receberam laser (L+AM+, L+AZ+ e L+F-) exibiram médias de UFC/mL inferiores ao grupo controle (L-F-), sugerindo que a redução microbiana observada foi provocada pelo laser e não pela terapia fotodinâmica.

Utilizando a mesma metodologia desse trabalho, Sousa et al.¹⁰⁰ (2007) avaliaram os efeitos da fotossensibilização de *C. albicans* (ATCC 18804) por laser de baixa potência (Arseneto de Gálio Alumínio com comprimento de onda de 660nm) associado ao corante azul de metileno a 1 mg/mL. Esses autores verificaram que o grupo L+AM+ apresentou média de UFC/mL (Log) significativamente menor (4,54) em relação ao grupo controle (5,26). Além disso, foi observado que o uso isolado do laser também reduziu o número de microrganismos, entretanto essa redução não foi tão significativa, com média de 4,91 UFC/mL (Log).

Souza et al.¹⁰¹ (2006) estudaram os efeitos da fotossensibilização de diferentes espécies de *Candida* pelo azul de metileno associado ao laser de baixa potência (Arseneto de Gálio Alumínio com comprimento de onda de 685nm). A terapia fotodinâmica foi eficaz na redução microbiana, apresentando médias de UFC/mL de 4,68 para *C. albicans* (ATCC 18804), 4,20 para *C. krusei* (ATCC 6258) e 4,72 para *C. tropicalis* (ATCC 13803) em relação aos grupos controle, respectivamente, com médias de 5,69, 5,46 e 5,68. Os grupos tratados

com laser isoladamente também exibiram diminuição no número de UFC/mL, entretanto essa diferença foi estatisticamente significativa apenas para *C. tropicalis*.

Provavelmente, neste trabalho não foi encontrada redução microbiana com a terapia fotodinâmica (L+AM+ e L+AZ+) como nos trabalhos anteriormente citados porque foram estudadas cepas clínicas de *Candida*, provenientes da cavidade bucal de pacientes em tratamento prolongado com antibiótico.

Os corantes fenotiazínicos, como o azul de metileno e azul de toluidina, já foram muito estudados em terapia fotodinâmica (WILSON e MIA¹¹⁴ 1993; SOUKOS et al.⁹⁹ 1998; WAINWRIGHT¹¹¹ 1998; USACHEVA et al.¹⁰⁸ 2001; WONG et al.¹¹⁶, 2005). Assim, foi proposta desse trabalho estudar novos fotossensibilizadores para as infecções fúngicas, como o azuleno.

O azuleno como fotossensibilizador foi primeiramente estudado por Garcez³⁷ (2002) na terapia fotodinâmica em endodontia. Esse autor verificou que a redução microbiana de *E. faecalis* em meio de cultura pelo azuleno foi significativamente mais eficaz que o azul de toluidina e azul de metileno. Brasil et al.¹⁰ (2006) avaliaram a ação do corante azuleno associado à pasta ENDO/PTC sobre culturas de *C. albicans*. O autor relatou não haver efeito fungicida da terapia fotodinâmica com esse corante sobre as diferentes espécies de *Candida*. As diferenças observadas nos estudos de Garcez³⁷ (2002) e Brasil et al.¹⁰ (2006) podem ser atribuídas ao microrganismo estudado.

Os microrganismos respondem de modo diferente à ação da terapia fotodinâmica. As bactérias Gram-positivas são geralmente mais susceptíveis à terapia fotodinâmica quando comparada às bactérias Gram-negativas. Essa característica é explicada pelas diferenças na estrutura da parede celular. As células Gram-negativas possuem uma barreira formada por uma estrutura complexa, incluindo duas bicamadas lipídicas, enquanto as células Gram-positivas possuem apenas uma única

bicamada lipídica, sendo então mais permeáveis aos fotossensibilizadores (HAMBLIM e HASAN⁴², 2002, DEMIDOVA e HAMBLIM²⁵, 2005). As leveduras são mais resistentes à terapia fotodinâmica do que as bactérias por apresentarem membrana nuclear, que representam uma barreira adicional para a penetração do fotossensibilizador (DEMIDOVA e HAMBLIM²⁵, 2005).

Esses dados podem explicar os excelentes resultados da terapia fotodinâmica sobre *Staphylococcus* obtidos no estudo de Miyabe et al.⁶⁵ (2007). Utilizando metodologia idêntica a esse trabalho, esses autores estudaram os efeitos da terapia fotodinâmica com azul de metileno sobre cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas da cavidade bucal de pacientes submetidos a antibioticoterapia prolongada para o tratamento da tuberculose pulmonar. Foi encontrada redução de 99,97 a 100% das espécies de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. schleiferi*, *S. capitis*, *S. haemolyticus* e *S. lentus*.

No presente trabalho, o uso isolado do laser levou a uma redução no número de UFC/mL de *Candida*. Entretanto essa redução foi pequena, de 5,71 para 5,22 UFC/mL (Log), quando comparada a redução microbiana alcançada pela PDT em outros trabalhos, como redução de 2 a 3 log₁₀ de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (PRATES et al.⁷⁶ 2007).

O efeito do laser de baixa intensidade sobre *Candida* também foi descrito por Maver-Biscanin et al.⁵⁸ (2005). Esses autores avaliaram o efeito do laser sobre *C. albicans* em dois pacientes com inflamação palatal causada pelo uso de prótese total. Os pacientes foram irradiados com diferentes comprimentos de onda e diferentes tempos (830 nm por 5 min e 685 nm por 10 min). Após a terapia, houve regressão no processo inflamatório e diminuição no número de colônias de *Candida* coletadas do palato.

Neste trabalho, os grupos que receberam o fotossensibilizador isoladamente (L-AM+ e L-AZ+) apresentaram

resultados semelhantes ao grupo controle (L-F-), indicando que a dose dos corantes testadas (azul de metileno 0,1% e azuleno 1%) não apresentou toxicidade para os microrganismos.

Além disso, os corantes utilizados no presente estudo apresentaram uma concentração aceitável de aplicação de acordo com a literatura citada, não provocando toxicidade ou manchamento da estrutura dentária mesmo aplicada diretamente na mucosa bucal (GARCEZ et al.³⁶, 2003; SOUZA et al.¹⁰¹ 2006).

Navarro et al.⁶⁶ (2005) relataram que as concentrações indicadas para os corantes fenotiazínicos não devem ultrapassar 0,1%, pois acima desta concentração, esses corantes tornam-se tóxicos e provocam o manchamento da dentina, tornando o tratamento inviável quanto à estética.

Núñez et al.⁶⁹ (2003) observaram que o azuleno, em forma líquida ou em gel, apresentou manchamento do esmalte e dentina somente na concentração de 25%. Em concentrações inferiores não ocorreu manchamento da estrutura dentária.

O sucesso da terapia fotodinâmica realizada *in vitro* sobre cepas padrão de *Candida* já foi relatado por vários autores (WILSON e MIA¹¹⁴, 1993; SOUZA et al.¹⁰¹, 2006; BLISS et al.⁸, 2004). Atualmente, torna-se necessário o desenvolvimento de trabalhos em cepas clínicas e animais experimentais, buscando assim um protocolo ideal de terapia fotodinâmica para o tratamento da candidose bucal.

7 CONCLUSÃO

Concluiu-se que as cepas clínicas de *Candida* analisadas foram resistentes a terapia fotodinâmica com azul de metileno e azuleno nos parâmetros utilizados neste estudo.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 Almeida OP, Scully C. Fungal infections of the mouth. Braz J Oral Sci. 2002; 1(1):19-26.
- 2 Alves SH, Silva GM, Scopel PA, Oliveira LTO, Costa JM, Milan EP, et al. Isolamento de *Candida dubliniensis* da mucosa oral de um paciente com SIDA, no Rio Grande do Sul. Rev AMRIGS. 2000; 44(3/4):185-7.
- 3 Appleton SS. Candidiasis: pathogenesis, clinical characteristics and treatment. J Calif Dent Assoc. 2000; 28(12):942-8.
- 4 Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. Arch Oral Biol. 1980; 25(1):1-10.
- 5 Baillie GS, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42 (8):1900-5.
- 6 Batista JM, Birman EG, Cury AE. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. Rev Odontol Univ São Paulo 1999; 13(4):343-8.

* Baseado em:

Internacional Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referentes [homepage na Internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em : http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- 7 Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsford SR, Pankhurst CL, Tinsley GF, et al. Use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples. J Clin Microbil. 1995; 33(11):3025-7.
- 8 Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(6):2000-6.
- 9 Bonnett R, White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC. Hydroporphyrins of the meso-tetra (hydroxyphenyl) porphyrin series as tumour photosensitizers. Biochem J. 1989; 261:277-80.
- 10 Brasil CO, Castro MR, Khouri S, Arisawa EAL. Avaliação, *in vitro*, da terapia fotodinâmica em cultura de *Candida albicans*. In: Anais do X Encontro latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação da Universidade do Vale do Paraíba; 2006; São José dos Campos. São Paulo: UNIVAP; 2302-5.
- 11 Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenite diode laser. J Dent. 1994; 22(5):273-8.
- 12 Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001; 9(7):327-35.
- 13 Caminos DA, Spesia MB, Durantini EN. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N, N, N-trimethylammoniumpropoxy) phenyl and 4-(trifluoromethyl) phenyl groups. Photochem Photobiol Sci. 2006; 5:56-65.

- 14 Candido CR, Azevedo RVP, Komesu MC. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. Rev Soc Bras Med Trop. 2000; 33(5): 437-42.
- 15 Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? J Dent Res. 1995; 74(5): 1152-61.
- 16 Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindós G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. Rev Esp Quimioterap. 2006; 19(2):130-9.
- 17 Carrillo-Muñoz AJ, Tur C, Estivill D, Montsant L, Carceller A, Hernández-Molina JM, Torres-Rodríguez JM. Resistencia *in vitro* al fluconazol e itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida* spp y *Cryptococcus neoformans*. Rev Iberoam Micol. 1997; 14:50-4.
- 18 Castro TL, Coutinho HDM, Gedeon CC, Santos JM, Santana WJ, Souza LBS. Mecanismos de resistência da *Candida* spp antifúngicos. Infarma 2006; 18(9/10):30-5.
- 19 Catão MHCV. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. Rev Bras Patol Oral 2004; 3(4):214-8.
- 20 Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Pérez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to Photofrin mediated phototoxicity. Antimicrobiol Agents Chemother. 2005; 49(10):4288-95.

- 21 Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2003; 18:51-5.
- 22 Cotter G, Kavanagh K. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. *Brit J Biomed Sci.* 2000; 57:241-9.
- 23 Coutinho F, Giordano V, Santos CM, Carneiro AF, Amaral NPA, Touma MC, et al. O efeito do laser de baixa energia no crescimento bacteriano *in vitro*. *Rev Bras Ortop.* 2007; 42(8):248-53.
- 24 Dellinger M. Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol.* 1996; 64(1):182-7.
- 25 Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(6):2329-35.
- 26 Donnely RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res* 2008; 163(1):1-12.
- 27 Donnely RF, McCarron PA, Tunney MM, Woolfson AD. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 2007; 86:59-59.

- 28 Dougherty TJ. Yearly Review. Photosensitizers:therapy and detection of malignant tumors. Photochem Photobiol. 1987; 45(6):879-89.
- 29 Edell ES, Cortese DA. Photodynamic therapy in the management of early superficial squamous cell carcinoma as an alternative to surgical resection. Chest 1992; 102(5):1319-22.
- 30 Ellepola ANB, Samaranayake PL. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. Arch Oral Biol. 1998; 43(12):999-1007.
- 31 Embleton LM, Sean PN, Heywood W, Menon CD, Cookson BD, Wilson M. Development of a novel system for lethal photosensitization of antibiotic resistant of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(9):3690-6.
- 32 Fabris C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S, et al. Photosensitization with Zinc(II) Phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. Cancer Res. 2001; 61:7495-500.
- 33 Faria RL, Martins JS, Colombo CED, Junqueira JC, Jorge AOC. Terapia fotodinâmica para o tratamento da candidose bucal em ratos. Anais do III Congresso de Ex-alunos e Jornada Odontológica da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. 2007. (Resumo).
- 34 Gad F, Zabra T, Francis KP, Hasan T, Hamblin MR. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice. Photochem Photobiol Sci. 2004; 3:451-8.

- 35 Gale CA, Bendel CM, McClellan M, Hauser M, Becker JM, Berman J, et al. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science* 1998; 279(27):1325-58.
- 36 Garcez AS, Souza FR, Nuñez SC, Kather JM, Ribeiro MS. Terapia fotodinâmica em odontologia: laser de baixa potência para redução microbiana. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 2003; 57(3):223-6.
- 37 Garcez Segundo AS. Laser em baixa intensidade associado a fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2002.
- 38 Genovese WJ, Prokopowitsch I. Características físicas da radiação laser. In: Genovese WJ. Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo: Santos; 2007. Cap.2. p.5-12.
- 39 Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NAR. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology* 1998; 144:829-38.
- 40 Grandi G, Silva ML, Streit C, Wagner JCB. A mobilization regimen to prevent mandibular hypomobility in irradiated patients: an analysis and comparasion of two techniques. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12:E105-9.

- 41 Grinholc M, Szramka B, Olender K, Craczyk A. Bactericidal effect of photodynamic therapy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain with the use of various porphyrin photosensitizers. *Acta Biochim Polonica* 2007; 54(3):3-5.
- 42 Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3:436-50.
- 43 Harris AD, Castro J, Sheppard DC, Carmeli Y, Samore MH. Risk factors for nosocomial candiduria due to *Candida glabrata* and *Candida albicans*. *Clin Infect Dis.* 1999; 29:926-8
- 44 Hernandez S, Gonzales GM, McCarthy DI, Colombo AL, Najvar LK, et al. . Alternatives to amphotericin B for *Candida rugosa* infection. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54:447-80.
- 45 Jorge AOC, Koga-Ito CY, Gonçalves CR, Fantinato V, Unterkircher CS. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1997; 11(4):1-9.
- 46 Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al.. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006; 38:468-81.
- 47 Karu TI. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *J Quantun Eletron.* 1987; QE23(10):1703-17.

- 48 Koga-Ito CY, Martins CAP, Jorge AOC. Estudo do gênero *Candida*. In: Jorge AOC. Princípios de microbiologia e imunologia. São Paulo: Santos; 2006. Cap.15. p.219-35.
- 49 Koga-Ito CY, Martins CAP, Loberto JCS, Santos SSF, Jorge AOC. *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from patients with chronic periodontitis and from control patients. Braz Oral Res. 2004; 18(1):80-4.
- 50 Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect. 2002; 50(4):243-60.
- 51 Kuhn DM, Mukherjee PK, Clark TA, Pujol C, Chandra J, Hajjeh RA, et al. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. Emerg Infect Dis. 2004; 10(6):1074-80.
- 52 Kurachi C, Melo CS, Marcassa LG, Zílio SC, Bagnato VS, Cestari Filho GA, et al. Implantação clínica da terapia fotodinâmica no Brasil: breve histórico e resultados alcançados. Rev Soc Bras Cancer. 2002; 20:33-41.
- 53 Lemos MMC, Miranda JL, Souza MSGS. Estudo clínico, microbiológico e histopatológico da estomatite por dentadura. Rev Bras Patol Oral. 2003; 2(1):3-10.
- 54 Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. Quim Nova. 2000; 23(2):273-43.

- 55 Machado AHA. Avaliação de um novo fotossensibilizante para terapia fotodinâmica [dissertação]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento; 2006.
- 56 Mateos SB. Uma luz poderosa. Revista Assoc Paul Cir Dent. 2005; 59(6):407-14.
- 57 Matsuki M, Kanatsu H, Watanabe T, Ogasawara A, Mikami T, Matsumoto T. Effects of antifungal drugs on proliferation signals in *Candida albicans*. Biol Pharm Bull. 2006; 29(5):919-22.
- 58 Maver-Biscanin M, Mravak-Stipetic M, Jerolimov V. Effect of low-level laser therapy on *Candida albicans* growth in patients with denture stomatitis. Photomed Laser Surg. 2005; 23(3):328-32.
- 59 Maza JL, Elguezabal N, Prado C, Ellacuría J, Soler I, Pontón J. *Candida albicans* adherence to resin-composite restorative dental material : influence of whole human saliva. Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; 94:589-92.
- 60 Mello NR, Taguchi H, Jorge J, Pedro RJ, Almeida OP, Fukushima K, et al. Oral *Candida* flora from brazilian human immunodeficiency virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99(4):425-31.
- 61 Menezes EA, Augusto KL, Freire CCF, Cunha FA, Montenegro RM, Montenegro Junior RM. Freqüência e atividade enzimática de *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes diabéticos do serviço de endocrinologia de hospital de Fortaleza-CE. J Bras Patol Med Lab. 2007; 43(4):241-4.

- 62 Moreira ACA, Falcão AFP, Andrade AP, Souza ER. Isolamento de *Candida parapsilosis* em paciente com diagnóstico clínico de candidíase atrófica crônica. Rev Cien Med Biol. 2002; 1(1):124-8.
- 63 Moreira D, Spolidório DMP, Rodrigues JAO, Boriollo MFG, Pereira CV, Rosa EAR, et al. *Candida* spp. Biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba-SP, Brazil. Pesq Odontol Bras. 2001; 15(3):187-95.
- 64 Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. Infect Immun. 1998; 47(1):11-4.
- 65 Miyabe M, Junqueira JC, Barbosa JO, Querido SMR, Jorge AOC, Maldonado EP. Efeito antimicrobiano sobre cepas de *Staphylococcus* isolados de pacientes submetidos à antibioticoterapia prolongada. Braz Oral Res. 2007; 21(suppl1):242.
- 66 Navarro RS, Eduardo CP, Zezell DM, Ribeiro SM. Terapia fotodinâmica no tratamento restaurador atraumático. In: Imparato JC et al. Tratamento restaurador atraumático: técnicas de mínima intervenção para o tratamento da doença cárie dentária. Curitiba: 2005. Cap. 20. p.341-59.
- 67 Navas, EAFA. Prevalência e susceptibilidade aos antifúngicos de isolados de leveduras do gênero *Candida* da cavidade bucal de pacientes com hanseníase [dissertação]. São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista; 2007.

- 68 Neves LS, Silva CMS, Henriques JFC, Cançado RH, Henriques RP, Janson G. A utilização do laser em ortodontia. Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial. 2005; 10(5):149-56.
- 69 Núñez SC, Garcez AS, Souza FR, Hayek RRA, Jorge AOC, Ribeiro MS. Avaliação da penetração de agentes fotossensibilizantes para terapia fotodinâmica. ABLO news 2003; 1(4):14.
- 70 Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. Trends Microbiol. 2003; 11(6):272-9.
- 71 Oliveira MSM, Mikami Y, Miyaji M, Gabas R, Moretti ML. Determinação da frequência de *Candida* spp na cavidade oral de pacientes graves internados no Hospital de Clínicas-UNICAMP, através de testes fenotípicos. Rev Panam Infectol. 2006; 8(4):16-20.
- 72 Panackal AA, Gribskov JL, Staab JF, Kirby KA, Rinaldi M, Marr, KA. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. J Clin Microbiol. 2006; 44(5):1740-3.
- 73 Panagoda GJ, Samaranayake LP. The relationship between the cell length, adhesion to acrylic and relative cell surface hydrophobicity of *Candida parapsilosis*. Med Mycol. 1998; 36:373-8.
- 74 Patel M, Shackleton JT, Coogan MM. Effect of antifungal treatment on the prevalence of yeasts in HIV-infected subjects. J Med Microbiol. 2006; 55:1279-84.

- 75 Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. J Clin Microbiol. 1996; 34(1):58-61.
- 76 Prates RA, Yamada Junior AM, Suzuki LC, Hashimoto MCE, Cai S, Grouw-Soares S, et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Photochem Phtotobiol Biol. 2007; 86(1):70-6.
- 77 Perussi RJ. Inativação fotodinâmica de microrganismos. Quím Nova. 2007; 30(4):988-94.
- 78 Pinto PM, Oliveira RD, Lyon JP. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical isolates of *Candida* spp. obtained from patients with different predisposing factors to candidosis. Microbiol Res. 2006; 7.
- 79 Pires MFC, Correa B, Gambale W, Paula CR. Experimental model of *Candida albicans* (serotipes A and B) adherence *in vitro*. Braz J Microbiol. 2001; 32(3):1-10.
- 80 Querido SMR. Microrganismos superinfectantes na cavidade bucal de indivíduos submetidos a antibioticoterapia para tratamento de tuberculose pulmonar [tese]. São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista; 2006.
- 81 Ramage G, VandeWalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 2001; 18: 163-70.

- 82 Ribeiro JN, Jorge RA, Silva AR, Flores AV, Ronchi LM, Tedesco AC. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. *Ecl Quím.* 2007; 32(1):7-14.
- 83 Rosa FM, Hammerschmitt T, Souza HP. Utilização do laser de baixa potência na prevenção e terapêutica da mucosite oral. *Stomatos.* 2005; 11(21):41-7.
- 84 Rovaldi CR, Pievsky A, Sole NA, Friden PM, Rothstein DM, Spacciapoli P. Photoactive porphyrin derivate with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(12):3364-7.
- 85 Safdar A, Van Rhee F, Henslee-Downey JP, Singhal S, Mehta J. *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia after high-risk allogenic marrow transplantation: no adverse affect of low-dose fluconazole prophylaxis on incidence and outcome. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 28:873-8.
- 86 Sakar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res.* 1993; 28(3):204-10.
- 87 Samaranayake YH, Samaranayake LP, Pow EHN, Beena VT, Yeung KWS. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(9):3296-302.

- 88 Santos EB, Schwrtz Filho HO, Schwartz EA, Ramos Junior ES. Perfil da saúde bucal e presença de *Candida* na cavidade bucal de pacientes atendidos nas clínicas odontológicas da UEPG. *Biol Health Sci.* 2002; 8(1):57-73.
- 89 Segal E, Trygerman O, Gov Y, Sandovsky-Losica H, Berdicevsky I. Adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells: effect of antimycotics. *J Mycol Med.* 1997; 7:71-6.
- 90 Serrano-Granger C, Cerero-Lapiedra R, Campo-Trapero J, Del Rio-Highsmith J. *In vitro* study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. *Int J Prosthodont.* 2005; 18(5):392-8.
- 91 Setúbal CA. Procura por novos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2007.
- 92 Shivaprakasha S, Radhakrishnan K, Karim PMS. *Candida* ssp. other than *Candida albicans*: a major cause of fungaemia in a tertiary care centre. *Indian J Med Microbiol.* 2007; 25(4):405-7.
- 93 Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(8):869-80.
- 94 Silva VV, Diaz MCJ, Febré N. Vigilancia de la resistencia de leveduras a antifúngicos. *Rev Chil Infect.* 2002; 19(Supl.2):149-56.

- 95 Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova*. 2002; 25(5):801-7.
- 96 Sims CR, Paetznick VL, Rodrigues JR, Chen E, Ostrosky-Zeichner L. Correlation between microdilution, E-test, and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(6):2105-8.
- 97 Soares RRS. Estudo de propriedades da clorofila e da feofitina a visando a terapia fotodinâmica [dissertação]. Maringá: Universidade Estadual Maringá; 2006.
- 98 Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Chen OS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, et al. . Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod*. 2006; 32(10): 979-84.
- 99 Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Target antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(10):2595-601.
- 100 Sousa RC, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AOC. Fotossensibilização de *Candida albicans* por laser de baixa potência. *Braz Oral Res*. 2007; 21(1):71.
- 101 Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AOC. Fotossensibilization of different *Candida* species by low power laser light. *J Photochem Photobiol Biol*. 2006; 83:34-8.

- 102 Sternberg CD. Porphyrin based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedrons Report. J Clin Laser Med Surg* 1993; 54(17):233-41.
- 103 Sulewski JG. Historical survey of laser dentistry. *Dent Clin North Am.* 2000; 44(4):717-52.
- 104 Sundstrom P. Adhesion in *Candida* spp. *Celular Microb.* 2002, 4(8): 461-69.
- 105 Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93(2):155-60.
- 106 Thomson WM, Lawrence HP, Broadbent JM, Poulon R. The impact of xerostomia on oral-health-related quality of life among younger adults. *Health Quality Lifes Outcomes* 2006; 4(86):1-7.
- 107 Titã SPS, Perussi JR. The effect of porphyrins on normal and transformed mouse cell lines in the presence of visible light. *Braz J Med Biol.* 2001; 34(10):1331-6.
- 108 Usacheva MN, Teichert CM, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001; 29:165-3.

- 109 Vandeputte P, Larcher G, Begès T, Renier G, Chabasse D, Bouchara JP. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrobiol Agents Chemother*. 2005; 49(11):4608-15.
- 110 Vieira JD, Ribeiro EL, Campos CC, Pimenta FC, Toledo OA, Nagato GM, et al. *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças com síndrome de Down: ocorrência e inibição do crescimento por *Streptomyces* sp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38(5):383-6.
- 111 Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42(5):13-28.
- 112 Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harty DWS, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. *Aust Dent J*. 1998; 43(1):45-50.
- 113 Welmer A, Bernhardt H. Adherence on buccal epithelial cells and germ tube formation in the continuous flow culture of clinical *Candida albicans* isolates. *Mycoses* 1997; 40:363-8.
- 114 Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med*. 1993; 22(8):354-7.
- 115 Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol*. 1993; 8:182-7.

- 116 Wong TW, Wang YY, Sheu HM, Chuang YC. Bactericidal effects of toluidine blue-mediated photodynamic action on *Vibrio vulnificus*. *Antimicrob Agents Chemotger*. 2005; 49(3):895-902.
- 117 Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57:680-4.
- 118 White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(6):1704-13.
- 119 Yildirim MS, Hasanreisoglu U, Hasirci N, Sultan N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. *J Oral Rehabil*. 2005; 32:518-25.
- 120 Zanin ICJ, Lobo MM, Rodrigues LKA, Pimenta LAF, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emiting diode. *Eur J Oral Sci*. 2006; 114(1):64.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa - Local

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Fernando José dos Santos, 777 - Jd. São Otávio
CEP 12261-970 - F. (12) 5947-9028
Fax (12) 5947-9010 - unfy@fod.uesp.br

 **CERTIFICADO**
Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 05/2007-PH/CEP, sobre "Efeitos da terapia fotodinâmica sobre cepas de *Cândida* isoladas de pacientes submetidos à antibioticoterapia prolongada", sob a responsabilidade de **MARTA MAJEWSKI**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 13 de fevereiro de 2007.



Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

ANEXO B - Tabelas 3 a 10.

Tabela 3 - Estatística descritiva dos dados de UFC/mL (Log) de *C. albicans* (n=30) obtidos nos grupos tratados com: laser e azul de metileno (L+AM+), laser e azuleno (L+AZ+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-AM+), azuleno (L-AZ+) e apenas solução fisiológica (L-F-).

Valores	L+AM+	L+AZ+	L+F-	L-AM+	L-AZ+	L-F-
Média	5,07	5,31	5,26	5,69	5,69	5,71
DP*	0,37	0,39	0,37	0,20	0,21	0,26
Mínimo	4,20	4,30	4,69	5,09	5,20	5,26
Mediana	5,04	5,25	5,27	5,68	5,68	5,75
Máximo	5,68	5,90	6,01	5,96	6,10	6,34

*DP: desvio-padrão

Tabela 4 - Estatística descritiva dos dados de UFC/mL (Log) de *C. tropicalis* (n=24) obtidos nos grupos tratados com: laser e azul de metileno (L+AM+), laser e azuleno (L+AZ+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-AM+), azuleno (L-AZ+) e apenas solução fisiológica (L-F-).

Valores	L+AM+	L+AZ+	L+F-	L-AM+	L-AZ+	L-F-
Média	5,06	5,18	4,94	5,22	5,23	5,29
DP	0,38	0,34	0,32	0,32	0,34	0,30
Mínimo	4,36	4,62	4,11	4,62	4,51	4,85
Mediana	5,19	5,12	4,95	5,28	5,28	5,25
Máximo	5,60	5,98	5,51	5,79	5,79	5,93

*DP: desvio-padrão

Tabela 5 - Estatística descritiva dos dados de UFC/mL (Log) de *C. glabrata* (n=24) obtidos nos grupos tratados com: laser e azul de metileno (L+AM+), laser e azuleno (L+AZ+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-AM+), azuleno (L-AZ+) e apenas solução fisiológica (L-F-).

Valores	L+AM+	L+AZ+	L+F-	L-AM+	L-AZ+	L-F-
Média	5,81	5,85	5,44	6,01	5,98	5,91
DP	0,22	0,23	0,57	0,15	0,12	0,18
Mínimo	5,00	5,47	4,30	5,64	5,69	5,55
Mediana	5,86	5,87	5,50	5,98	5,97	5,92
Máximo	6,15	6,21	6,13	6,32	6,23	6,27

*DP: desvio-padrão

Tabela 6 - Estatística descritiva e teste de Tukey dos dados de UFC/mL (Log) de *C. parapsilosis* (n=12) obtidos nos grupos tratados com: laser e azul de metileno (L+AM+), laser e azuleno (L+AZ+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-AM+), azuleno (L-AZ+) e apenas solução fisiológica (L-F-).

Valores	L+AM+	L+AZ+	L+F-	L-AM+	L-AZ+	L-F-
Média	5,26	5,78	5,11	5,82	5,90	5,93
DP*	0,30	0,14	0,10	0,09	0,13	0,08
Mínimo	5,00	5,44	5,00	5,66	5,66	5,74
Mediana	5,11	5,79	5,07	5,81	5,89	5,95
Máximo	5,73	5,97	5,27	5,97	6,20	6,06

*DP: desvio-padrão

Tabela 7 - Estatística descritiva dos dados de UFC/mL (Log) de *C. kefyr* (n=12) obtidos nos grupos tratados com: laser e azul de metileno (L+AM+), laser e azuleno (L+AZ+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-AM+), azuleno (L-AZ+) e apenas solução fisiológica (L-F-).

Valores	L+AM+	L+AZ+	L+F-	L-AM+	L-AZ+	L-F-
Média	5,45	5,64	5,51	5,84	5,97	6,03
DP*	0,43	0,33	0,55	0,27	0,34	0,29
Mínimo	4,84	5,14	4,77	5,32	5,20	5,46
Mediana	5,57	5,73	5,56	5,83	6,04	6,12
Máximo	5,91	6,04	6,25	6,22	6,30	6,38

*DP: desvio-padrão

Tabela 8 - Estatística descritiva dos dados de UFC/mL (Log) de *C. stellatoidea* (n=6) obtidos nos grupos tratados com: laser e azul de metileno (L+AM+), laser e azuleno (L+AZ+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-AM+), azuleno (L-AZ+) e apenas solução fisiológica (L-F-).

Valores	L+AM+	L+AZ+	L+F-	L-AM+	L-AZ+	L-F-
Média	5,64	5,87	5,80	5,96	6,03	5,96
DP*	0,14	0,21	0,22	0,16	0,03	0,06
Mínimo	5,39	5,61	5,64	5,73	5,98	5,87
Mediana	5,66	5,90	5,86	5,95	6,04	5,96
Máximo	5,81	6,08	6,18	6,25	6,08	6,04

*DP: desvio-padrão

Tabela 9 - Estatística descritiva dos dados de UFC/mL (Log) de *C. krusei* (n=6) obtidos nos grupos tratados com: laser e azul de metileno (L+AM+), laser e azuleno (L+AZ+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-AM+), azuleno (L-AZ+) e apenas solução fisiológica (L-F-).

Valores	L+AM+	L+AZ+	L+F-	L-AM+	L-AZ+	L-F-
Média	5,09	5,33	4,92	5,54	5,47	5,48
DP*	0,18	0,14	0,16	0,21	0,06	0,14
Mínimo	4,81	5,06	4,73	5,12	5,35	5,28
Mediana	5,09	5,33	4,90	5,62	5,48	5,45
Máximo	5,30	5,48	5,18	5,70	5,53	5,68

*DP: desvio-padrão

Tabela 10 - Estatística descritiva e teste de Tukey dos dados de UFC/mL (Log) de *C. lipolytica* (n=6) obtidos nos grupos tratados com: laser e azul de metileno (L+AM+), laser e azuleno (L+AZ+), laser e solução fisiológica (L+F-), azul de metileno (L-AM+), azuleno (L-AZ+) e apenas solução fisiológica (L-F-).

Valores	L+AM+	L+AZ+	L+F-	L-AM+	L-AZ+	L-F-
Média	5,20	5,35	4,62	5,52	5,56	5,61
DP*	0,05	0,08	0,08	0,06	0,11	0,21
Mínimo	5,14	5,30	4,47	5,46	5,39	5,44
Mediana	5,19	5,32	4,65	5,49	5,62	5,50
Máximo	5,30	5,53	4,69	5,61	5,68	5,94

*DP: desvio-padrão

Majewski M. Effects of the photodynamic therapy on the isolated *Candida* strains of the oral cavities of patients who underwent a prolonged antibioticotherapy [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2008.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of the photodynamic therapy using methylene blue and azulene on isolated Candida strains of the oral cavity of patients who underwent a prolonged antibioticotherapy to treat lung tuberculosis. Twenty Candida strains were studied: 5 C. albicans, 4 C. tropicalis, 4 C. glabrata, 2 C. parapsilosis, 2 C. kefyr, 1 C. krusei, 1 C. stellatoidea and 1 C. lipolytica. Each strain underwent 6 experimental conditions: laser in combination with methylene blue (L+MB+), laser in combination with azulene (L+AZ+), irradiation with laser (L+P-), treatment with methylene blue (L+MB+), treatment with azulene (L+AZ+), and treatment with physiologic solution as a control group (L-P-). After the treatment of each strain, serial dilutions and spreading on Sabouraud dextrose agar were performed. Data from colony forming units per milliliter (CFU/ml) were analyzed by Tukey's test ($p < 0.05$). The results showed that all the groups treated with laser (L+MB+, L+AZ+ and L+P-) presented the lowest mean CFU/ml (Log) value in relation to the groups treated without laser (L+MB+, L+AZ+ and L+P-). The groups treated with photodynamic therapy (L+MB+, L+AZ+) presented an average of CFU/ml (Log) similar or higher to the L+P- group. In summary, the results showed that isolated Candida strains of the oral cavity of patients who underwent a prolonged antibioticotherapy were resistant to the photodynamic therapy with methylene blue and azulene.

KEYWORDS: *Candida spp., photodynamic therapy; low-power laser light; methylene blue; azulene*