



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

LÍRIAN SILVA DE FIGUEIREDO FREITAS

**EFEITO ANTIMICROBIANO DE MÚLTIPLAS SESSÕES DE
TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE BIOFILMES DE *Candida*
spp. FORMADOS *in vitro***

2015

LÍRIAN SILVA DE FIGUEIREDO FREITAS

**EFEITO ANTIMICROBIANO DE MÚLTIPLAS SESSÕES DE TERAPIA
FOTODINÂMICA SOBRE BIOFILMES DE *Candida* spp.
FORMADOS *in vitro***

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2015

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2014.

Freitas, Lírian Silva de Figueiredo

Efeito antimicrobiano de múltiplas sessões de tereapia
fotodinâmica sobre biofilmes de Candida spp. formados in vitro /
Lírian Silva de Figueiredo Freitas. - São José dos Campos : [s.n.],
2015.

82 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2015.

Orientadora: Juliana Campos Junqueira.

1. Candida spp. 2. Estomatite sob prótese . 3. Terapia
fotodinâmica . 4. Fotossensibilizadores. 5. Laser. I. Junqueira,
Juliana Campos, orient. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de
São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III.
Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. IV. UNESP
- Univ Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

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, 04 de fevereiro de 2015
E-mail: lirianfigueiredo@hotmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adjunta Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Silvia Maria Querido Matheus

FAPI - Faculdade de Pindamonhagaba
Campus de Pindamonhagaba

Prof. Dr. José Chibebe Junior

FAPI - Faculdade de Pindamonhagaba
Campus de Pindamonhagaba

Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 04 de fevereiro de 2015.

DEDICATÓRIA

A Deus, pois sem Ele sou nada.

A Santa Clara, que sempre iluminou meus pensamentos e caminhos.

Ao meu esposo Marcos por tudo que representa, pelo amor que dedica a mim e a nossa família, pela compreensão e companheirismo. Sua ajuda e apoio foram fundamentais na concretização desse sonho.

A minha mãe, que sempre teve uma palavra de apoio e incentivo nas horas difíceis. Por suas orações e promessas. A meu pai por todo carinho durante os momentos de minha vida. Ao meu irmão pelo convívio de todos os anos de nossas vidas.

A minha amada filha Layra luz da minha vida, por quem tenho um amor único e especial. Sua chegada me fortaleceu.

A minha gata Lilikinha. Amor verdadeiro, que torna minha vida mais alegre.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, Professora Adjunta Juliana Campos Junqueira primeiramente pela oportunidade de realização de um grande sonho, pela dedicação e conhecimentos transmitidos. Obrigada por contribuir na minha caminhada profissional.

Ao Professor Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge, a quem tenho grande admiração pelo profissional que representa. O meu sincero agradecimento pelos ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Ao ICT-UNESP – Instituto de Ciência e tecnologia, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Titular Estevao Tomomitsu Kimpara.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, sob a coordenação da Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira e da vice-coordenação da Profa. Dra. Ana Lia Abinder.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida por todo o período de desenvolvimento desse trabalho.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal e aos demais professores do ICT/Unesp pelo convívio e ensinamentos durante a realização dos créditos.

A Profa. Dra. Luciane Dias Oliveira sempre tão receptiva e prestativa.

A Simone Furgeri Godinho Vilela, pessoa competente e prestativa, pelas valiosas sugestões na banca de qualificação da minha tese.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Sérgio Giovanni Alves e Domingos Gonçalves Pontes, essenciais para concretização da minha pesquisa.

Aos funcionários da Seção da Pós-Graduação pela colaboração duranteos anos que aqui estive. A todos os funcionários da biblioteca pelo auxílio prestado quando necessário e solicitado.

Aos funcionários da Seção Técnica de Informática. Em especial a Carlos e Newton que gentilmente sempre me ajudaram quando precisei.

À todos os colegas do laboratório de Microbiologia e Imunologia e aos demais colegas pela amizade e convívio.

"Bendita seja todas as palavras ditas em silêncio. Porque não há força maior que a fé, nem voz mais alta que a oração."

Vera Queiroz

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE QUADROS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS.....	14
RESUMO.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1 <i>Candida</i> spp.....	26
2.2 Estomatite Protética.....	29
2.3 Biofilme de <i>Candida</i>	32
2.4 Terapia Fotodinâmica.....	36
3 OBJETIVOS.....	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Micro-organismos e grupos experimentais.....	43
4.2 Preparo da Suspensão Padronizada de <i>Candida</i>	44
4.3 Fotosensibilizadores.....	45
4.4 Fonte de Luz.....	46
4.5 Confeção dos corpos de prova.....	48
4.6 Formação do Biofilme <i>in vitro</i>	48
4.7 Terapia fotodinâmica.....	49
4.8 Contagem de UFC/corpo de prova.....	50
4.9 Análise Estatística.....	50
5 RESULTADOS.....	51
5.1 <i>Candida glabrata</i>	51
5.2 <i>Candida albicans</i>	54
5.3 <i>Candida tropicais</i>	57
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÃO.....	68
8 REFERÊNCIAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura1 - Espectrofotômetro AJX-1900, Micronal, São Paulo, Brasil utilizado para a padronização das suspensões dos micro-organismos.....	44
Figura 2 - A) Filtração do azul de metileno em membrana com poros de 0,22 µm; B) Filtração da eritrosina com poros de 0,22 µm.....	45
Figura 3 - Laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (Easy Laser, Clean Line, Taubaté, Brasil).....	47
Figura 4 - Diodo Emissor de Luz (LED) de cor verde (MMOptics, São Carlos, São Paulo, Brasil).....	47
Figura 5 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de <i>C. glabrata</i> submetidos a 1 aplicação com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, P < 0,05) quando comparado com o grupo controle com os demais grupos).....	51

Figura 6 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. glabrata* submetidos a 2 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos..... 52

Figura 7 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. glabrata* submetidos a 3 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos..... 52

Figura 8 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. glabrata* submetidos a 4 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos..... 53

Figura 9 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. glabrata* submetidos a 5 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos..... 53

Figura 10 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. albicans* submetidos a 1 aplicação com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com o grupo tratado com Led e eritrosina..... 54

Figura 11 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. albicans* submetidos a 2 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Não houve diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos..... 55

Figura 12 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. albicans* submetidos a 3 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Não houve diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos..... 55

Figura 13 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. albicans* submetidos a 4 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com o grupo tratado com Laser+azul de metileno e Led+eritrosina..... 56

<p>Figura 14 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de <i>C. albicans</i> submetidos a 5 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos.....</p>	56
<p>Figura 15 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de <i>C. tropicalis</i> submetidos a 1 aplicação com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Não houve diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos.....</p>	57
<p>Figura 16 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de <i>C. tropicalis</i> submetidos a 2 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com o grupo Led e eritrosina.....</p>	58
<p>Figura 17 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de <i>C. tropicalis</i> submetidos a 3 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos.....</p>	58

Figura 18 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. tropicalis* submetidos a 4 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Não houve diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos..... 59

Figura 19 - Valores das médias e desvios padrões em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. tropicalis* submetidos a 2 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com o grupo Led e eritrosina..... 59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Número de ensaios experimentais realizados para cada espécie de <i>Candida</i>	43
Quadro 2 - Parâmetros do laser e do LED a serem utilizados na Terapia Fotodinâmica.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

%	= percentual
µg/mL	= microgramas por mililitro
µL	= micrômetro
µm	= Microlitro
AM	= azul de metileno
BHI	= Brain heart infusion (infusão cérebro coração)
células/mL	= células por mililitro
cm ²	= centímetro quadrado
°C	= grau Celsius
h	= hora
J	= Joule
kGy	= KiloGray
L	= litro
Laser	= Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LED	= Light Emitting Diode
Log	= logaritmo
mg/L	= miligrama por litro
mg/mL	= miligrama por mililitro
min	= minuto
mL	= milímetro
mm	= mililitro
mW	= miliwatts
NaCl	= cloreto de sódio
nm	= nanômetro

s	= segundo
TFD	= Terapia fotodinâmica
TFDA	= Terapia fotodinâmica antimicrobiana
UFC/corpo de prova	= unidade formadora de colônia por corpo de prova
UFC/mL	= unidade formadora de colônia por mililitro
W	= watts
μM	= micromolar

Freitas LSF. Efeito antimicrobiano de múltiplas sessões de terapia fotodinâmica sobre biofilmes de *Candida* spp. formados *in vitro* [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

RESUMO

Vários estudos *in vitro* demonstraram que a terapia fotodinâmica (TFD) apresenta efeitos antimicrobianos sobre as leveduras do gênero *Candida*, podendo representar uma terapia alternativa e coadjuvante no tratamento da estomatite protética. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antifúngico de múltiplas sessões de terapia fotodinâmica sobre biofilmes de *Candida* formados na superfície de resina acrílica. Para realização desse trabalho, biofilmes monotípicos de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram formados, durante 5 dias, em corpos de prova confeccionados com resina acrílica termicamente ativada. A seguir, foram realizadas 5 sessões de terapia fotodinâmica, em intervalos de 24 horas, sobre os biofilmes previamente formados. Foram avaliadas 2 modalidades de terapia fotodinâmica, incluindo aplicação de Laser de Arseneto de Gálio e Alumínio associado ao fotossensibilizador azul de metileno ou terapia com Diodo Emissor de Luz (LED) verde e fotossensibilizador eritrosina. Os grupos controles foram tratados apenas com solução fisiológica. Após a realização de cada aplicação da terapia fotodinâmica, os biofilmes aderidos aos corpos de prova foram submetidos à homogeneização ultra-sônica e as células dispersas foram semeadas em Ágar Sabouraud Dextrose (37 °C / 48 h) para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/corpo de prova). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey considerando-se nível de significância de 5%. Para todos os microorganismos os resultados da redução de UFC (log) foram comparados aos controles da primeira, segunda, terceira, quarta e quinta aplicações com o Laser e com o LED. Para *C. glabrata* as reduções para cada aplicação foram respectivamente de 3,22 e 4,83; 1,49 e 2,21; 1,6 e 2,05;

1,53 e 5,09 e 2,75 e 3,03. Para *C. albicans* foram 0,12 e 0,36; 0,54 e 0,93; 0,15 e 0,06; 0,96 e 0,75 e 0,89 e 1,82. *C. tropicalis* apresentou as seguintes reduções: 0,16 e 0,14; 1,52 e 2,84; 1,86 e 2,1; 1,81 e 2,39 e 0,86 e 1,36. Concluímos que a TFD mediada por Laser e Led foram efetivas na redução de biofilmes de *Candida*. Para todos os microorganismos a maior redução microbiana foi alcançada com TFD mediada por Led e eritrosina. Além disso, *C. glabrata* foi à espécie que apresentou maior susceptibilidade à FTD.

Palavras-Chave: *Candida spp.* Estomatite sob prótese. Terapia fotodinâmica. Laser. LED. Fotossensibilizadores.

Freitas LSF. Antimicrobial effect of photodynamic therapy multiple-sessions on biofilms of *Candida* spp. formed *in vitro* [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

ABSTRACT

Several *in vitro* studies have demonstrated the antimicrobial effects of photodynamic therapy (PDT) against yeast of the genus *Candida*, representing an alternative or coadjuvant tool for the treatment of denture stomatitis. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antifungal effect of multiple PDT sessions on *Candida* biofilms formed on the surface of acrylic resin. For this purpose, monotypic biofilms of *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata* were grown for 5 days on test specimens consisting of thermally activated acrylic resin. Next, the biofilms formed were submitted to five sessions of PDT at intervals of 24 hours. Two modalities of PDT were evaluated: a gallium-aluminum-arsenide laser combined with methylene blue as photosensitizer, and a green light-emitting diode (LED) and erythrosine as photosensitizer. The control groups were only treated with saline. After each application of PDT, the biofilms adhered to the test specimens were submitted to ultrasonic homogenization and the dispersed cells were seeded onto Sabouraud dextrose agar (37 °C, 48 h) for determination of colony-forming units (CFU/test specimen). Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test were used for analysis of the results, adopting a level of significance of 5%. For all microorganisms, the results of CFU(log) reduction were compared to controls of the first, second, third, fourth and fifth application of the laser and LED. For *C. glabrata*, the reductions in each application were, respectively, 3.22 and 4.83, 1.49 and 2.21, 1.6 and 2.05, 1.53 and 5.09, and 2.75 and 3.03. Reductions of 0.12 and 0.36, 0.54 and 0.93, 0.15 and 0.06, 0.96 and 0.75, and 0.89 and 1.82 were observed for *albicans*. *Candida tropicalis* showed the following reductions: 0.16 and 0.14, 1.52 and 2.84, 1.86 and 2.1, 1.81 and 2.39, and 0.86 and 1.36. In conclusion, laser- and LED-mediated PDT were effective in reducing *Candida* biofilms. For all microorganisms tested, the highest microbial reduction was achieved with PDT mediated by LED and erythrosine. Furthermore, *C. glabrata* was the species most susceptible to PDT.

Keywords: *Candida* spp. Denture stomatitis. Photodynamic Therapy. Laser. LED. Photosensitizers.

1 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Candida* fazem parte da microbiota bucal e podem causar diferentes tipos de candidoses quando fatores locais ou sistêmicos interrompem o equilíbrio ecológico, tornando o fungo um patógeno oportunista (Moreira et al., 2002). Entre os fatores predisponentes da candidose bucal pode-se citar: uso de antibióticos de amplo espectro, imunossupressão, tabagismo, idade avançada, uso de corticosteróides inalados e presença de próteses totais ou parciais (Farah et al., 2010, Williams et al., 2011; Junqueira, 2012). As manifestações clínicas das candidoses bucais são classificadas em pseudomembranosa, eritematosa, hiperplásica e lesões associadas à *Candida*, incluindo a estomatite protética, queilite angular e glossite rombóide mediana (Niimi et al., 2010; Junqueira, 2012).

Embora, *C. albicans* continue sendo a espécie mais isolada da candidose bucal, o número de infecções causadas por espécies não *albicans* tem aumentado significativamente nas últimas décadas. Uma variedade de espécies de *Candida* tem sido isoladas das lesões de candidose bucal, incluindo *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, entre outras (Silva et al., 2011).

O aumento das espécies de *Candida* não *albicans* nas lesões de candidose pode ser atribuído, em parte, aos avanços nos métodos de diagnóstico, como o uso de meios de culturas primários com capacidade de diferenciação entre espécies de *Candida* e a introdução de técnicas moleculares como rotina para o diagnóstico. Um número de outros fatores tem sido implicados no aumento da prevalência das espécies de *Candida*, incluindo amplo uso de determinadas práticas médicas, como a terapia imunossupressiva, uso de antibióticos de amplo

espectro e aumento do número de procedimentos cirúrgicos invasivos. Além disso, o aumento do número das espécies de *Candida* na candidose pode ser um reflexo da seleção de espécies na presença de determinados antifúngicos, devido ao alto nível de resistência demonstrado pelas espécies não *albicans* (Silva et al., 2011).

Na cavidade bucal, as leveduras do gênero *Candida* podem se aderir à superfície das mucosas ou à superfícies de próteses, levando a formação de biofilmes. Os biofilmes são definidos como comunidades microbianas que estão ligadas a uma superfície sólida e incorporados em uma matriz de material extracelular (Ramage et al., 2005).

Uma característica determinante do biofilme é a comunicação entre células. Esta dinâmica da comunicação, chamada *quorum sensing*, fornece um mecanismo de regulação microbiana com a função de modular a presença da expressão de genes de resistência aos antimicrobianos, facilitar o crescimento de espécies benéficas e impedir o crescimento de espécies não desejadas no biofilme (Thomas, Nakaishi 2006). Desse modo, os micro-organismos presentes no biofilme são menos sensíveis aos tratamentos com antimicrobianos (Smith, 2005; Hancock et al., 2007; Seneviratne et al., 2008; Ten Cate et al., 2009). Já foram relatados perfis de resistência de biofilme de *Candida* de 30 a 2000 vezes maiores do que as células planctônicas para os antifúngicos anfotericina B, fluconazol, iitraconazol e cetoconazol (Dunne, 2002).

A formação de biofilme pelas espécies de *Candida* é um passo importante para o desenvolvimento de candidose, pois a estomatite protética, que afeta 65% dos indivíduos edêntulos. Apesar do uso de agentes antifúngicos para o tratamento da estomatite protética, infecções recidivantes são frequentemente observadas (Dai et al., 2012). Chandra et al. (2001) demonstraram que biofilmes de *C. albicans* formados em modelos *in vitro* de polimetilmetacrilato (PMMA) foram altamente resistentes aos antifúngicos usados. Esses autores observaram ainda que

a resistência aos antifúngicos estava correlacionada com o tempo de formação do biofilme e estágio de maturação do mesmo.

Atualmente, poucos medicamentos antifúngicos estão disponíveis para tratamento das infecções em comparação aos antibióticos. Esse fato pode ser considerado reflexo do reconhecimento recente da importância das infecções fúngicas nos seres humanos e da dificuldade envolvida no desenvolvimento de um medicamento com atividade contra uma célula eucariótica com baixa toxicidade para o hospedeiro. Os agentes antifúngicos são classificados de acordo com o seu modo de ação em: (I) antifúngicos poliênicos (nistatina e anfotericina B) que promovem ruptura da membrana celular do fungo, (II) antifúngicos azóis (fluconazol, cetoconazol, clotrimazol e itraconazol) responsáveis pela inibição da síntese do ergosterol da membrana celular, (III) antifúngicos equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) com ação na parede celular, inibindo a síntese do β -1,3-D-glucano, e (IV) 5-fluorocitosina que induzem a síntese incorreta de RNA e interferem com a replicação do DNA (Niimi et al., 2010; Williams et al., 2011).

O tratamento da candidose bucal é realizado com antifúngicos tópicos, incluindo a nistatina, anfotericina B e clotrimazol, ou com antifúngicos sistêmicos como fluconazol, cetoconazol e itraconazol. O tratamento com nistatina, anfotericina B e clotrimazol resulta apenas em melhora transitória da candidose, sendo muito comum a ocorrência de recidivas, principalmente em casos de imunodeficiência. Melhores resultados são obtidos com antifúngicos sistêmicos como fluconazol. Entretanto, o uso desses medicamentos provoca efeitos colaterais e desenvolve resistência microbiana (Wilson et al., 1993; Donnelly et al., 2007; Farah et al., 2010; Niimi et al., 2010). Alguns autores, frente ao aumento da resistência aos antifúngicos convencionais vêm buscando alternativas para tratamento das lesões de candidose, como a terapia fotodinâmica.

Terapia fotodinâmica é um tratamento complementar aplicado em neoplasias de diversas naturezas, malignas ou não, sendo aprovada a partir de meados da década de setenta em muitos países desenvolvidos, como Estados Unidos e Japão (Donnelly et al., 2007; Nowis et al., 2005; Jori et al., 2006). Trata-se de uma terapia localizada, indolor e que não causa injúria aos tecidos do indivíduo. Essa terapia consiste na aplicação de um fotossensibilizador e uma fonte de luz, como laser de baixa intensidade ou Diodo Emissor de Luz (LED). Quando o fotossensibilizador é irradiado com comprimento de onda adequado ocorrem reações intracelulares citotóxicas induzindo a morte celular (Navarro et al., 2005).

Vários estudos realizados *in vitro* demonstraram que a PDT foi efetiva para redução das leveduras do gênero *Candida* tanto para as células em crescimento planctônico como organizadas em biofilme, empregando diferentes fotossensibilizadores como os fenotiazínicos (azul de metileno e azul de toluidina), porfirinas, verde de malaquita e fitalocianinas, sendo que os fenotiazínicos e as porfirinas foram os mais extensivamente estudados (Wilson, Mia, 1993; Wainwright, Crossley, 2004; Souza et al., 2006,2010; Chabrier-Roselló et al., 2008; Pereira et al., 2011 Junqueira et al., 2010).

Os efeitos da terapia fotodinâmica também foram avaliados em estudos *in vivo*, utilizando modelos de candidose bucal em animais experimentais (Junqueira et al., 2009; Martins et al., 2011) e camundongos imunossuprimidos (Teichert et al., 2002; Mima et al., 2010; Costa et al., 2012). Esses estudos demonstraram que a terapia fotodinâmica apresentou efeito fungicida sobre *C. albicans* na candidose induzida em animais, sugerindo que a terapia fotodinâmica pode ser utilizada para tratar candidose bucal.

Mima et al. (2012) realizaram um estudo clínico para avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica sobre *Candida* spp. na estomatite protética. Foram estudados 40 pacientes com estomatite

protética divididos em dois grupos. No Grupo I os pacientes receberam tratamento convencional com Nystatina por 15 dias. No Grupo II os pacientes receberam aplicações de terapia fotodinâmica no palato e na base da prótese, 3 vezes por semana, durante 15 dias, totalizando 6 sessões de PDT. No dia 0 (baseline), 15, 30, 60 e 90 foram feitas observações clínicas e coletas de amostras do palato e da prótese para a contagem de UFC/mL de *Candida*. Os resultados demonstraram que no final do tratamento (dia 15), tanto a terapia fotodinâmica como o tratamento convencional reduziram significativamente o número de *Candida* do palato e da prótese. Entretanto, após 30 dias, o número de UFC/mL passou a aumentar significativamente. O sucesso clínico foi alcançado em 53% dos pacientes tratados com Nystatina e 45% dos pacientes tratados com terapia fotodinâmica. Os autores sugeriram que para aumentar a taxa de sucesso clínico são necessários estudos para avaliar o número de sessões de PDT, tempo de tratamento, tipos de fotossensibilizadores e parâmetros de irradiação das fontes de luz.

Diante do exposto, pode-se observar que em estudos de modelos de biofilmes *in vitro*, em modelos de candidose experimental em animais e em estudos clínicos, a terapia fotodinâmica levou a uma redução do biofilme de *Candida*, mas não causou erradicação completa dos micro-organismos. Segundo Schneider et al. (2012), durante a aplicação da terapia fotodinâmica, a fotossensibilização letal para os micro-organismos ocorre apenas nas camadas superficiais do biofilme microbiano. Por meio de microscopia confocal, esses autores verificaram que a terapia fotodinâmica reduziu o número de células de *S. mutans* que estavam na superfície do biofilme, sendo capaz de atingir apenas 10 µm da profundidade do biofilme formado em modelo artificial. Desse modo, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos para alcançar uma melhor ação da terapia fotodinâmica nos biofilmes formados por leveduras do gênero *Candida*. Assim, o objetivo desse trabalho foi acompanhar a

ação antifúngica de múltiplas sessões de terapia fotodinâmica sobre biofilmes de *Candida* formados *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Candida* spp.

Leveduras do gênero *Candida* são habituais na cavidade bucal humana e podem causar doença na presença de fatores predisponentes. *Candida albicans* não está distribuída uniformemente na boca; o dorso da língua parece ser o reservatório primário do fungo, a partir do qual o restante da mucosa, superfície dos dentes, biofilme dentário e saliva tornam-se colonizados secundariamente (Jorge, 2006). A aderência às células hospedeiras, formação de hifas e secreção de enzimas, como proteinases e fosfolipases são alguns fatores de virulência de *C. albicans* (Jackson et al., 2007).

Normalmente, os micro-organismos do gênero *Candida* são comensais da cavidade bucal, estando presentes em 25 a 75% dos indivíduos aparentemente saudáveis. Mas, podem transformar-se na forma parasitária e causar diferentes tipos de candidoses bucais quando fatores locais ou sistêmicos interrompem o equilíbrio ecológico (Golecka et al., 2006; Jorge et al., 1997; Moreira et al., 2002).

No corpo humano residem inúmeros micro-organismos que são capazes de modular a transição entre a saúde e doença. Quando as condições do hospedeiro favorecem o crescimento de patógenos, as espécies oportunistas podem se tornar dominantes e causar doenças. A cavidade bucal representa um meio complexo onde muitas espécies de

bactérias e fungos podem interagir e competir para formar biofilmes multi-espécies sobre a mucosa e superfícies dos dentes. As leveduras do gênero *Candida* freqüentemente se associam com espécies de bactérias orais comensais para causar ou aumentar a infecção nas mucosas do dorso da língua e do palato (Scherma et al., 2004; Junqueira et al., 2009; Falsetta, Koo, 2014).

Candida é o patógeno fúngico mais comum nos seres humanos em todo o mundo e tornou-se um grande problema clínico devido ao crescente número de pacientes imunocomprometidos, que são mais susceptíveis à infecção. Além disso, o número de antifúngicos disponíveis para tratamento da candidose é limitado e o surgimento de cepas de *Candida* resistentes aos antifúngicos é crescente (Wong et al., 2014).

C. albicans é a espécie mais patogênica e mais frequentemente isolada das lesões de candidose bucal, bem como da candidose vulvovaginal, cutânea e sistêmica (Li et al., 2007; Fallahi et al., 2013; Silk, 2014). *C. albicans* corresponde de 50 a 80% dos isolados de *Candida* da cavidade bucal, estando sozinha ou associada com outras espécies de *Candida* (Coronado-Castellote, Jiménez-Soriano, 2013). O número de espécies não *albicans* isoladas das lesões de candidose tem aumentado significativamente, principalmente devido ao aprimoramento das técnicas para a identificação das espécies de *Candida*, que permitem uma maior precisão e rapidez nesta identificação (Moreira et al., 2002).

Martins et al. (2002) observaram em seu estudo que leveduras do gênero *Candida* foram isoladas do enxágüe bucal de 28 (31,82%) pacientes com periodontite. *Candida albicans* foi a espécie mais freqüente nos isolamentos (83,34%), seguindo-se *C. glabrata* (10%) e *C. tropicalis* (6,66%). Da bolsa periodontal, foram isoladas leveduras do gênero *Candida* em 7,96% dos pacientes (n = 7), sendo que 85,72% das amostras foram identificadas como *C. albicans* e 14,28% como *C. glabrata*. Dos indivíduos examinados, 22 (25%) apresentaram leveduras

do gênero *Candida* somente na cavidade bucal, 1 (1,13%) somente na bolsa periodontal e 6 (6,82%) apresentaram tanto na cavidade bucal quanto na bolsa periodontal.

No estudo de Guinea et al. (2013), um total de 781 amostras de 767 pacientes com fungemia (14 deles com fungemia mista) foram coletadas em 29 hospitais na Espanha. As espécies mais freqüentemente encontradas foram *C. albicans* (44,6%), *C. parapsilosis* (24,5%), *C. glabrata* (13,2%), *C. tropicalis* (7,6%), *C. krusei* (1,9%), *C. guilliermondii* (1,7%) e *C. lusitaniae* (1,3%). Outras espécies de *Candida* e não-*Candida* representaram cerca de 5% dos isolados.

Embora *Candida tropicalis* tenha se tornado cada vez mais importante como agente patogênico humano, pouco se sabe sobre seu potencial para causar doenças (Moralez et al., 2013). *C. tropicalis* é um dos fungos patogênicos emergentes associado com altas taxas de mortalidade (40 a 70%). Como *C. albicans* e *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* são capazes de formar tubos germinativos, pseudo-hifas e hifas, mas os genes envolvidos no crescimento de hifas e virulência ainda não estão esclarecidos em *C. tropicalis*. Recentemente, isolados de *C. tropicalis* resistentes aos antifúngicos azóis foram identificados de vários pacientes ao redor do mundo, tornando o tratamento mais difícil (Chen et al., 2014).

Candida glabrata possui susceptibilidade intrínseca reduzida ao fluconazol e está sendo cada vez mais isolada das lesões de candidose, principalmente, entre os adultos e a população de idosos no hemisfério Norte, onde ela pode ser responsável por transmitir até 30% de infecções do sangue em programas de vigilância de base populacional. Segundo Arendrup et al. (2014), 20-30% dos casos de candidemia hoje envolvem espécies com resistência intrínseca ao fluconazol ou equinocandinas.

Sajith et al. (2014) analisaram pacientes hospitalizados, identificando *C. albicans* em 64 (97,4%) dos pacientes e *C. glabrata* em apenas um paciente. A resistência ao fluconazol foi vista em 38 (59,4%)

pacientes com *C. albicans* e também no paciente com *C. glabrata*. Todos os isolados de *C. albicans* resistentes ao fluconazol tiveram MIC > 128 µg/mL, sugerindo uma resistência muito elevada. *Candida glabrata* também apresentou resistência a esse medicamento.

Devido à alteração epidemiológica na distribuição de espécies de *Candida*, bem como crescente tendência de resistência adquirida desses fungos aos antimicrobianos, torna-se necessário o estudo de terapias antifúngicas efetivas para as espécies de *Candida* (Fallahi et al., 2013; Coronado-Castellote, Jiménez-Soriano, 2013). Além disso, a candidose está associada com a formação de biofilmes, que são comunidades microbianas estruturadas em várias camadas e dificultam a penetração dos agentes antimicrobianos, prejudicando assim a efetividade do agente antifúngico (Bhattacharyya et al., 2013).

2.2 Estomatite Protética

A estomatite protética consiste em uma lesão eritematosa que pode ser observada no palato sob uma prótese, que tem causa multifatorial, sendo a candidose o fator mais importante no seu surgimento. Os pacientes mais suscetíveis à estomatite protética associada à candidose são idosos, devido às alterações imunológicas, doenças sistêmicas subclínicas, uso de agentes farmacológicos, deficiências nutricionais e exposição a doenças oportunistas. A estomatite protética, geralmente, não é uma condição que traz danos sérios ao paciente, entretanto, a mucosa inflamada pode tornar-se incomoda para o suporte para prótese, podendo dificultar sua utilização. Trata-se de uma lesão bucal extremamente freqüente, sendo de fundamental importância o

diagnóstico e tratamento adequados para a melhoria da qualidade de vida do paciente (Scalercio et al., 2007).

Infecções associadas à prótese são consideradas como fonte de complicações médicas na população idosa, portanto a higiene da prótese é uma questão de importância considerável para usuários de prótese total (Takahashi et al., 2014). Interações entre micro-organismos comensais e superfícies orais revestidas de saliva são eventos iniciais na colonização microbiana da cavidade bucal, que podem resultar em doenças orais, como a estomatite protética (Holmes et al., 2014). A estomatite protética é a doença oral mais comum entre os usuários de prótese total, afetando mais de um terço deste grupo. A estomatite protética está geralmente associada com leveduras do gênero *Candida* (Bencharit et al., 2012).

Candida albicans é um dos principais micro-organismos relacionados à etiologia da estomatite por prótese. A presença da prótese com base em resina acrílica possibilita o crescimento de leveduras tanto na prótese como na mucosa (Andrade et al., 2008). Devido à etiologia da doença ser multifatorial, modificações das atitudes, juntamente com tratamento, é necessário para a total eliminação de *Candida* (Skupien et al., 2013).

A estomatite protética foi classificada em Newton tipo I, uma inflamação simples local, que se manifesta em uma área discreta de inflamação no palato; Newton tipo II é o eritema generalizado envolvendo toda a área coberta pela prótese; e Newton tipo III representada por hiperplasia papilar do palato (Newton*, 1962 citado por Hadjieva et al., 2006).

Os fungos são as principais causas de infecções entre pacientes imunocomprometidos ou hospitalizados com doenças subjacentes graves. Espécies de *Candida* permanecem a mais importante causa de infecções oportunistas em todo o mundo, afetando principalmente pacientes com mais de 65 anos de idade (Flevari et al.,

*Newton AV. Denture soremouth. A possible etiology. B Dent J. 1962;112:357-60. *apud* Hadjieva H, Dimova M, Todorov S. Stomatitis protetica-A polyetiologic disorder. J IMAB. 2006;12(2);38-41.

2013). Lesões de cavidade bucal ocorrem principalmente em pacientes idosos provenientes do uso de próteses, devido à perda dos dentes. A prevalência de lesões causadas por prótese é alta, quando comparadas às demais lesões dos tecidos moles, principalmente a estomatite protética. Além disso, verificou-se que estas lesões acometem mais mulheres e a faixa etária entre 30 e 49 anos de idade. É necessário que após a instalação de próteses, os cirurgiões-dentistas se conscientizem da necessidade de acompanhamento dos seus pacientes com a finalidade de diagnosticar lesões precocemente (Maciel et al., 2008). Fatores funcionais e qualitativos das próteses estudados representaram uma tendência para a ocorrência da estomatite protética.

Esses mesmos fatores, avaliados isoladamente, não podem ser responsáveis pelas alterações da mucosa de suporte. Entre os fatores associados à estomatite protética, pode-se destacar a dimensão vertical de oclusão, estabilidade dinâmica e estática da prótese, além de aspectos qualitativos relacionados às condições encontradas no desdentado (Oliveira et al., 2000).

No estudo de Sakki et al. (1997), 780 indivíduos de 55 anos de idade, de Oulu, na Finlândia, foram examinados clinicamente, verificando-se que 452 deles usavam prótese total. Nesse estudo observou-se que a prevalência de estomatite protética foi maior entre os indivíduos com um estilo de vida pouco saudável, indivíduos com maiores contagens de Lactobacilos e indivíduos com má higiene oral. A taxa de secreção salivar e tabagismo também estavam associados com a presença de leveduras. Assim, os autores concluíram que a presença de fatores comportamentais que refletem no estilo de vida pode ser muito importantes no desenvolvimento da estomatite protética.

Baena-Moroy et al. (2005) coletaram saliva de 105 pacientes (62 do sexo feminino e 43 masculino) que usavam prótese dentária. Estomatite protética foi relatada em 50 pacientes. A presença de

C. albicans na mucosa e prótese foi de 51,4%. *Candida albicans* foi isolada em 66,7% a partir das próteses.

Atualmente, na prática odontológica é comum observarmos lesões orais decorrentes de uso de próteses iatrogênicas e até mesmo de uma orientação inadequada do paciente pelo cirurgião dentista quanto ao uso e higienização dessas próteses. Observa-se que as lesões mais citadas pelos autores como as estomatites, úlceras traumáticas e as hiperplasias, poderiam ser evitadas se após a instalação da prótese o profissional realizasse um ajuste adequado, orientasse o paciente quanto às técnicas de higienização e o acompanhasse, realizando controles periódicos (Goiato et al., 2005).

2.3 Biofilme de *Candida*

A boca fornece um ambiente que suporta uma população microbiana grande e variada. Os dentes são mineralizados, isso permite o acúmulo de massas de micro-organismos e seus produtos, que formam o biofilme (Tortora et al., 2008). Biofilme consiste de uma ou mais comunidades de micro-organismos embebidos em uma matriz ou glicocálice, que recobrem uma superfície sólida. A cárie dentária e a doença periodontal são as principais enfermidades da cavidade bucal influenciadas pela atividade patológica do biofilme dentário (Jorge et al., 2012).

A formação de biofilme é um processo multicelular complexo composto de adesão celular, crescimento celular, alteração morfogênica entre a forma de levedura e estados filamentosos e *quorum sensing* (Li et al., 2007). A medicina moderna está voltada para a

formação de biofilmes relacionados à infecções. Biofilmes são inerentemente tolerantes as defesas do hospedeiro e terapias antibióticas. Além disso, os biofilmes podem facilitar a disseminação da resistência aos antimicrobianos através da transferência de genes entre microorganismos (Fux et al., 2005; Johnson, 2008).

A adesão é um passo necessário para a formação de biofilme fúngico (Takahashi et al., 2014). A capacidade de formação de biofilmes em superfícies no hospedeiro ou em dispositivos médicos implantados aumenta a virulência de *C. albicans* conduzindo a resistência microbiana e proporcionando um reservatório para a infecção. Crescimento microbiano associado à dispositivos, incluindo biofilmes de *Candida*, representa mais da metade de todas as infecções microbianas humanas, este tipo de infecção geralmente leva a altas taxas de mortalidade, aumento dos custos com cuidados na saúde e terapia antimicrobiana prolongada (Racicova et al., 2010). A retenção de *C. albicans* em biofilmes associados com as superfícies dos dentes pode também representar um reservatório de fungos que podem mais tarde colonizar outro local ou até mesmo causar complicações sistêmicas (Falsetta, Koo, 2014). A organização do biofilme na cavidade oral promove resistência adicional aos agentes antimicrobianos (Vilela et al., 2012).

Segundo Ramage et al. (2005), *Candida albicans* pode formar biofilmes com relativa facilidade. No entanto, a avaliação macroscópica e microscópica destes biofilmes por diferentes técnicas revelou um nível de complexidade em sua estrutura. O biofilme de *C. albicans* forma-se em diferentes tipos de biomateriais e mostra propriedades e características arquitetônicas semelhantes. Essas comunidades de células são metabolicamente ativas e encaixadas em uma substância polimérica. Além disso, resistem às ações de agentes antifúngicos em concentrações que iria matá-los quando em crescimento planctônico.

A capacidade de formar biofilmes está intimamente associada com a capacidade de causar infecção, e como tal, deve ser considerado um fator de virulência importante durante a candidose. O biofilme resulta em resistência à medicamentos antifúngicos e proteção das defesas do hospedeiro, sendo que ambos carregam importantes repercussões clínicas. Microscópio Eletrônico de Varredura e Microscópio Confocal de Varredura a Laser foram usados para visualizar biofilmes de *C. albicans*. Biofilme maduro de *C. albicans* consistia de uma densa rede de células de leveduras e hifas incorporadas dentro de material exopolimérico. Esses biofilmes também exibiam uma estrutura tridimensional que demonstrou heterogeneidade espacial e uma arquitetura típica mostrando microcolônias com ramificações e canais de água. Testes de susceptibilidade antifúngica demonstraram o aumento da resistência das células sésseis de *C. albicans* ao fluconazol e anfotericina B quando comparados com suas contrapartes planctônicas (Ramage, 2005; Prazynska, Gospodarek, 2014).

Crescimento de biofilmes de *Candida albicans* e produção de matriz extracelular foram monitoradas por peso seco, ensaios colorimétricos e radioisótopos, e por Microscopia Eletrônica de Varredura. Sob condições de incubação estática a síntese de material de matriz foi mínima, mas aumentou significativamente quando os biofilmes em desenvolvimento foram submetidos a um fluxo de líquido com o resultado de que as células foram envoltas em polímero extracelular. Isso sugere que a produção de material de matriz pode contribuir para a resistência das células do biofilme com agentes antifúngicos (Hawser et al., 1998).

No estudo de Al-Fattani e Douglas (2006), material de matriz foi extraído a partir de biofilmes de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* e analisados quimicamente. Ambos continham hidrato de carbono, proteína, hexosaminas, fósforo e ácido urônico. No entanto, o principal componente da matriz em *C. albicans* era a glicose (32%), ao passo que em *C. tropicalis* a matriz foi hexosamina (27%). Para investigar

um possível papel para a matriz na resistência do biofilme à antifúngicos, biofilmes de *C. albicans* foram cultivados sob condições de fluxo contínuo em um dispositivo modificado de Robbins (MRD). Estes biofilmes produziram mais material de matriz que biofilmes cultivados estaticamente, e eram significativamente mais resistentes à anfotericina B. Os biofilmes de *C. tropicalis* sintetizaram grandes quantidades de material de matriz, mesmo quando cultivados estaticamente, e tais biofilmes foram completamente resistentes tanto à anfotericina B como ao fluconazol.

Biofilme presente em próteses podem ser controlados por métodos mecânicos, químicos e sanitização mecânica-química. Vários métodos estão disponíveis para desinfecção de próteses dentárias. As soluções químicas, tais como hipoclorito de sódio, iodo, álcool e clorexidina são frequentemente utilizados para fins de desinfecção. No entanto, existem várias desvantagens na utilização de tais agentes químicos para desinfecção da prótese (Dantas et al., 2014).

Durante os últimos anos, a estrutura de biofilmes de diversos ambientes foi avaliada e documentada através da utilização de uma ampla variedade de técnicas microscópicas, fisico-química e de biologia molecular, revelando uma estrutura geralmente complexa. Paralelamente a estas investigações, mais modelos matemáticos complexos e simulações foram desenvolvidos para explicar o desenvolvimento de estruturas e interações de biofilmes (Wimpenny et al., 2000).

2.4 Terapia Fotodinâmica

O aparecimento de resistência antifúngica dos fungos patogênicos promove esforços para achar um antimicrobiano alternativo para o qual esses micro-organismos não possam facilmente desenvolver resistência. Então, o desenvolvimento de modalidades terapêuticas alternativas está sendo realizado, como a terapia fotodinâmica (Moreira et al., 2002).

A terapia fotodinâmica baseia-se no princípio de que uma substância (o fotossensibilizador) se liga à célula-alvo e pode ser ativado por luz de um comprimento de onda adequado. Durante este processo, são formados radicais livres, que em seguida, produzem um efeito que é tóxico para a célula (Malik et al., 2010).

O uso prolongado de antibióticos aumenta a probabilidade de aquisição de resistência e a alta incidência de infecções polimicrobianas (Haidaris et al., 2013). A Terapia Fotodinâmica emergiu como uma modalidade terapêutica não invasiva para o tratamento de várias infecções causadas por bactérias, fungos e vírus (Jori et al., 2006). A Terapia Fotodinâmica representa uma alternativa efetiva de tratamento para infecções microbianas localizadas, como também em úlceras crônicas e infecções orais (Wainwright et al., 2004). O uso da TFD propõe também diminuir a frequência de recorrência ou propagação da infecção, resultando em uma internação hospitalar reduzida e um curso mais curto da antibioticoterapia pós-tratamento, reduzindo assim a pressão seletiva para a resistência à antibióticos (Haidaris et al., 2013).

A terapia fotodinâmica é uma reação química ativada por luz e corantes fotossensíveis, usada para destruição seletiva de um tecido e requer um agente fotossensibilizante no tecido-alvo, uma fonte de luz e oxigênio. (Issa, Manela-Azulay, 2010; Perussi, 2007). Estão disponíveis,

no momento, o ácido 5-aminolevulínico para tratamento de queratoses actínicas e o metilaminolevulinato, aprovado para tratamento de queratoses actínicas, carcinoma basocelular e doença de Bowen. As fontes de luz utilizadas para a terapia fotodinâmica devem emitir comprimentos de onda no espectro de absorção do fotossensibilizante escolhido. As lâmpadas LED (*light emitting diode*) são indicadas para a terapia fotodinâmica tópica no tratamento do câncer de pele não melanoma. A terapia fotodinâmica deve ser considerada, em particular, para pacientes que apresentam lesões superficiais, múltiplas, disseminadas e para pacientes imunossuprimidos. Terapia fotodinâmica tem sido indicada no tratamento do fotoenvelhecimento, acne, hidrosadenite, esclerodermia, psoríase, verrugas, leishmaniose, entre outras (Issa, Manela-Azulay, 2010).

A PDT (do inglês *Photodynamic Therapy*) além de ser aplicada em neoplasias de pele, pulmão, bexiga, entre outras, também é aplicada em micro-organismos patogênicos como bactérias, vírus e leveduras (Perussi et al., 2007). Infecções localizadas de origem microbiana podem ser tratadas pela PDT como tratamento complementar aos antimicrobianos ou como tratamento alternativo a esses fármacos (Caminos et al., 2006; Wilson et al., 1993).

A terapia fotodinâmica envolve duas fases. Na primeira fase, um fotossensibilizador sensível à luz é aplicado. A segunda etapa envolve a luz diretamente sobre a área tratada. Quando a luz é combinada com o fotossensibilizador, reações fototóxicas são induzidas e destroem células bacterianas. Mais de 400 compostos são conhecidos com propriedades fotossensibilizantes incluindo corantes, medicamentos, cosméticos, produtos químicos e muitas substâncias naturais (Malik et al., 2010).

Terapia fotodinâmica antimicrobiana é uma alternativa emergente para tratar infecções com base na utilização de fotossensibilizadores e luz visível (Paz-Cristobal et al., 2014). Micro-

organismos, tais como bactérias, fungos, leveduras e vírus (incluindo HIV), também podem ser inativados por luz visível, após o tratamento apropriado com um fotossensibilizador. Assim, a TFD torna-se um tratamento de baixo custo alternativo para infecções localizadas, lesões virais, acnes, e lesões fúngicas. Além disso, a inativação fotodinâmica pode ser utilizada para a desinfecção de sangue e seus subprodutos para utilização clínica, no tratamento de água potável, bem como na desintoxicação antimicrobiana de alimentos (Perussi, 2007).

Vários trabalhos sobre Terapia Fotodinâmica vêm sendo realizados no intuito de avaliar seus efeitos benéficos em tratamentos clínicos. Esta terapia é proposta como um potencial redutor de micro-organismos orais. Ainda não existe um protocolo definido quanto ao número de sessões ou quanto ao intervalo entre elas na quimioprevenção em indivíduos saudáveis e em pacientes imunossuprimidos (Issa, Manela-Azulay, 2010).

A terapia fotodinâmica não induz resistência bacteriana e apresenta mínimos efeitos colaterais e sistêmicos, sendo capaz de aumentar o conforto do paciente reduzindo a necessidade de retalhos, o tempo de tratamento e o risco de bacteriemias (Balata et al., 2010). Em alguns países, em virtude dos estímulos concedidos à pesquisa neste campo, diversos procedimentos clínicos têm sido estabelecidos, sendo que alguns deles já vêm tendo o seu emprego (Machado, 2000).

A terapia fotodinâmica é eficaz contra várias classes de micro-organismos, incluindo aqueles que exibem resistência aos antimicrobianos, e pode servir como um adjuvante útil para o padrão de atendimento reduzindo a carga microbiana. (Haidaris et al., 2013). A TFD é eficaz na eliminação de *C. albicans* independentemente do seu padrão de resistência antimicrobiana (Paz-Cristobal et al., 2014).

A terapia fotodinâmica não deve substituir os procedimentos dos tratamentos convencionais, mas deve ser aprimorada e ser coadjuvante ao tratamento convencional, já que o laser de baixa

intensidade é seguro, de fácil manipulação e aceitação pelo paciente, além de promover atividade antimicrobiana quando associado a um corante fotossensibilizador (Alfenas et al., 2011). Por ser um método benéfico e complementar as medidas convencionais, pesquisas na odontologia estão sendo desenvolvidas para tratamento da doença periodontal devido à resistência microbiana (Malik et al., 2010).

Kato et al., 2013 avaliaram os efeitos da inativação fotodinâmica antimicrobiana (TFD) sobre os mecanismos de patogenicidade de *C. albicans*, e verificaram se tais alterações poderiam ser mantidas nas células filhas. *C. albicans* foi exposta à inativação fotodinâmica antimicrobiana sub-letal usando azul de metileno como um fotossensibilizador combinado a um laser de GaAIs. *In vitro*, avaliou-se os efeitos da TFD sobre o crescimento de *C. albicans*, formação de tubo germinativo, sensibilidade ao estresse oxidativo e osmótico, integridade da parede celular e susceptibilidade ao fluconazol. *In vivo*, foi avaliado a patogenicidade de *C. albicans* em modelo de camundongo com infecção sistêmica. A sobrevivência dos animais foi avaliada diariamente. A TFD mediada por azul de metileno reduziu a taxa de crescimento e a capacidade de *C. albicans* para formar tubos germinativos, em comparação com células não tratadas. A sobrevivência dos camundongos sistemicamente infectados com *C. albicans* pré-tratados com TFD foi significativamente maior em comparação com camundongos infectados com a levedura e não tratados. A TFD aumentou na *C. albicans* a sensibilidade ao sulfato de sódio, cafeína e peróxido de hidrogênio. A CIM para fluconazol de *C. albicans* também foi reduzida após aplicações sub-letais de TFD mediada por azul de metileno. No entanto, nenhuma dessas características de patogenicidade foi alterada em células filhas de *C. albicans* submetidos à TFD. Estes dados sugerem que a TFD pode inibir fatores de virulência e reduzir *in vivo* a patogenicidade de *C. albicans*. A ausência de alterações em células filhas indica que efeitos de IFDA são transitórios. A redução de valores de CIM para fluconazol seguidos à

IFDA sugere que este antifúngico pode ser combinado com inativação fotodinâmica antimicrobiana para tratar infecções de *C. albicans*

Dovigo et al. (2013) avaliaram a inativação fotodinâmica de 15 isolados clínicos de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Cada isolado foi exposto à inativação fotodinâmica em forma planctônica e em biofilme. Independentemente da espécie, à inativação fotodinâmica promoveu uma redução significativa da viabilidade das leveduras planctônicas. A maior redução na viabilidade celular dos biofilmes foi equivalente a 0,9 log₁₀ para *C. albicans*, enquanto 1,4 e 1,5 log₁₀ reduções foram obtidas para *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente. A inativação fotodinâmica reduziu a atividade metabólica de biofilmes em 62,1, 76,0 e 76,9% para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente. No estudo de Costa et al. (2011) observou-se que *C. albicans* e *C. dubliniensis* foram susceptíveis a Eritrosina e LED, mas biofilmes de ambas espécies de *Candida* foram mais resistentes do que seu crescimento planctônico.

A terapia fotodinâmica se mostra como uma relevante e ascendente proposta de alternativa terapêutica para o tratamento odontológico, em especial no que se refere a sua atividade antimicrobiana, devido ao seu baixo custo, fácil empregabilidade e boa efetividade (Carneiro, Catão, 2012). TFD é uma ferramenta interessante para combater doenças infecciosas e para conter um maior desenvolvimento da resistência aos antibióticos e antifúngicos (Dosselli et al., 2014).

Diante do exposto, verifica-se que um dos fatores de virulência mais importante para o desenvolvimento da candidose bucal é a capacidade das espécies do gênero *Candida* em formar biofilmes sobre a superfície das mucosas ou próteses dentárias. Vários estudos *in vitro* demonstraram que leveduras de *Candida* organizadas em biofilmes são mais resistentes à terapia fotodinâmica do que leveduras em crescimento planctônico. Portanto, estudos que avaliem o impacto da terapia

fotodinâmica na desestabilização dos biofilmes de *Candida* são necessários para auxiliar na implantação de protocolos clínicos de tratamento para as infecções causadas pelas diferentes espécies de *Candida*, como a estomatite protética.

3 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram:

- a) Avaliar os efeitos antimicrobianos de múltiplas sessões de terapia fotodinâmica sobre biofilmes monotípicos de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* formados *in vitro* sobre corpos de prova de resina acrílica termicamente ativada;
- b) Comparar a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica mediada por Laser e Azul de Metileno com a terapia realizada por LED e eritrosina após múltiplas sessões.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos e grupos experimentais

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram *C. albicans* (ATCC 18804), *C. tropicalis* (ATCC 13803) e *C. glabrata* (ATCC 9030). Cada cepa de *Candida* foi submetida à 120 ensaios experimentais, totalizando 360 ensaios experimentais (Quadro 1).

Quadro 1 - Número de ensaios experimentais realizados para cada espécie de *Candida*

Tratamentos experimentais	Análises do Biofilme	Tempo (dias)					Total de ensaios
		1	2	3	4	5	
Laser e Azul de Metileno	UFC	8	8	8	8	8	40
LED e Eritrosina	UFC	8	8	8	8	8	40
Controle Sol. fisiológica	UFC	8	8	8	8	8	40
Total							120

4.2 Preparo da Suspensão Padronizada de *Candida*

A partir de cada espécie de *Candida*, foram preparadas suspensões padronizadas de micro-organismos contendo 10^7 células/mL. Inicialmente, as cepas foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubadas a 37 °C por 24 h. Após esse período, esses micro-organismos foram cultivados em caldo Sabouraud e incubados a 37 °C por 16 h. O crescimento de cada micro-organismo foi centrifugado a 1300 Xg durante 10 min, desprezando-se o sobrenadante e o sedimento foi suspenso em 10 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,85%).

A contagem do número de células foi realizada por meio de espectrofotômetro (AJX-1900, Micronal, São Paulo, Brasil) utilizando comprimento de onda de 530 nm (Figura 1).



Figura 1- Espectrofotômetro AJX-1900, Micronal, São Paulo, Brasil utilizado para a padronização das suspensões dos micro-organismos.

4.3 Fotosensibilizadores

Foram utilizados os fotossensibilizadores azul de metileno (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) na aplicação do laser e eritrosina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) na aplicação do LED. A solução de cada corante foi preparada pela dissolução do pó em solução fisiológica de NaCl (0,85%) na concentração de 300 μ M do azul de metileno (Souza RC et al., 2010) e 400 μ M da eritrosina (Costa et al., 2011). Como observado na figura 2, a esterilização dessas soluções foi feita por filtração em membrana com poros de diâmetro de 0,22 μ m (MFS, Dublin, EUA).

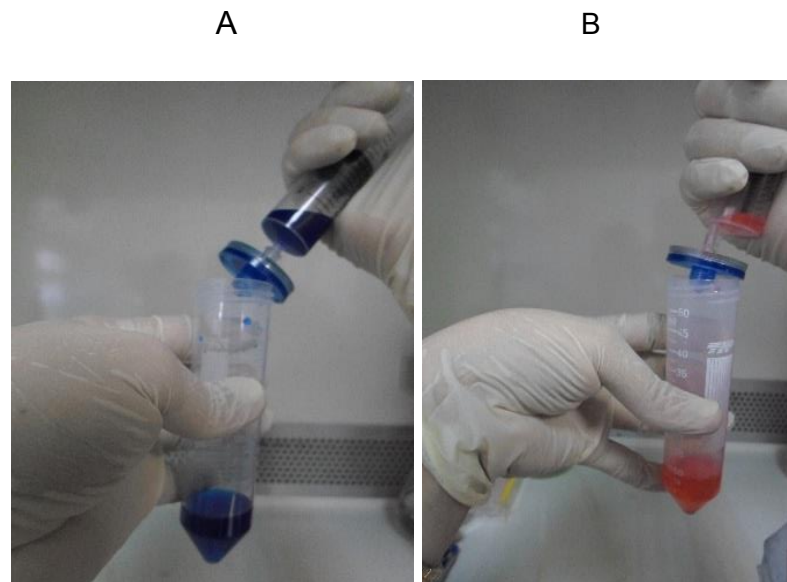


Figura 2 - A) Filtração do azul de metileno em membrana com poros de 0,22 μ m; B) Filtração da eritrosina com poros de 0,22 μ m.

4.4 Fonte de Luz

Para fotossensibilização dos corantes foi utilizado um laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (Easy Laser, Clean Line, Taubaté, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível), mostrado na figura 3 e o Diodo Emissor de Luz (LED) de cor verde (MMOptics, São Carlos, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 532 nm, mostrado na figura 4 correspondentes à faixa de comprimento de alta absorção dos fotossensibilizadores azul de metileno e eritrosina respectivamente. Os parâmetros do laser e do LED utilizados na terapia fotodinâmica foram baseados, respectivamente, nos estudos de Souza RC et al. (2010) e Costa et al. (2011) conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2 - Parâmetros do laser e do LED a serem utilizados na Terapia Fotodinâmica

Parâmetros	Laser	LED
Comprimento de onda	660 nm	532 nm
Potência	35 mW	90 mW
Energia	15 J	16,2 J
Área irradiada	0,78 cm ²	0,78 cm ²
Densidade de energia	20 J/cm ²	42,63 J/cm ²
Tempo de exposição	428 s	180 s



Figura 3 - Laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (Easy Laser, Clean Line, Taubaté, Brasil).



Figura 4 - Diodo Emissor de Luz (LED) de cor verde (MMOptics, São Carlos, São Paulo, Brasil).

4.5 Confeção dos corpos de prova

Para o desenvolvimento desse estudo foram confeccionados corpos de prova, medindo 10 mm de diâmetro, em resina acrílica termopolimerizável a base de polimetilmetacrilato (Vipi Cril plus, VIPI, Pirassununga, Brasil), que é rotineiramente utilizada para confecção de próteses dentárias. Os corpos de prova foram incluídos em muflas metálicas, prensados em prensa hidráulica por 2 h e posteriormente levados ao forno de microondas (ME18S, Electrolux) por 15 min (potência 10 W) e 5 min (potência 5 W). O acabamento dos corpos de prova foi feito com lixas d'água e o polimento com pedra pomes e branco de Espanha utilizando disco de feltro. A seguir, os corpos de prova foram submersos em água destilada por 48 h para liberação do monômero residual.

Os corpos de prova foram esterilizados por radiação gama Cobalto⁶⁰ (20 kGy por 6 h) pela Empresa Brasileira de Radiação (EMBRARAD, Cotia, SP, Brasil).

4.6 Formação do Biofilme *in vitro*

Para formação dos biofilmes foi utilizada metodologia baseada no estudo de Vilela et al., 2012.

Os corpos de prova esterilizados foram colocados, com auxílio de pinça estéril, nas placas de 24 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) contendo 2 mL de Caldo Infuso Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion*-Difco, Detroit, EUA) acrescido de 5% de sacarose. Cada poço da placa contendo um corpo de prova e Caldo BHI foi inoculado com 100 µL da suspensão microbiana padronizada. A placa foi incubada em agitação de 75 rpm (Quimis) a 37 °C por 5 dias. O micro-organismo foi inoculado

uma única vez e o caldo BHI acrescido de 5% de sacarose foi trocado a cada 24 h.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado dos poços e foi colocado 2 mL de solução fisiológica esterilizada, as placas foram agitadas por 5 min em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Esse processo de lavagem foi realizado 2 vezes a fim de remover as células não aderidas aos corpos de prova.

4.7 Terapia fotodinâmica

Após a formação dos biofilmes, os mesmos foram tratados com 5 aplicações de terapia fotodinâmica, em intervalos de 24 h.

Para cada aplicação da terapia fotodinâmica, os corpos de prova após a lavagem conforme descrito no item 4.6 foram submersos nos fotossensibilizadores, sendo então agitados por 10 min em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Posteriormente, os corpos de prova foram irradiados, com as placas abertas, com fonte de luz nos parâmetros anteriormente descritos. O grupo controle foi submetido às mesmas condições experimentais citadas acima, entretanto não recebeu fotossensibilizador e nem irradiação, sendo tratado apenas com solução fisiológica.

As irradiações dos biofilmes foram realizadas em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar e com a luz apagada utilizando-se um anteparo negro fosco com orifício de diâmetro coincidente ao da entrada do poço para evitar dispersão do feixe de luz.

4.8 Contagem de UFC por corpo de prova

Após cada irradiação (1, 2, 3, 4 e 5 dias), os corpos de prova foram colocados em tubo falcon contendo 10 mL de solução fisiológica esterilizada, e homogeneizados por 30 s, utilizando homogeneizador ultrasônico (Sonics Vibra Cell, São Paulo, Brasil) com amplificação de 25% com potência de 50 W, para dispersão das células do biofilme.

A seguir, foram realizadas diluições seriadas em solução fisiológica e alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas, com auxílio da Alça Drigalski, em duplicata, em placa com Ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA). Após o período de incubação de 48 h a 37 °C, as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por corpo de prova foram contadas e transformadas em logaritmo.

4.9 Análise Estatística

Os resultados da contagem de UFC/corpo de prova foram analisados estatisticamente, pela análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey, com nível de significância de 5%, utilizando Programa Minitab.

5 RESULTADOS

5.1 *Candida glabrata*

Os resultados obtidos na contagem de UFC/corpo de prova foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey considerando-se nível de significância de 5%. Os resultados da redução de UFC em log comparada ao controle da primeira, segunda, terceira, quarta e quinta aplicações com o laser e com o LED foram respectivamente de 3,22 e 4,83; 1,49 e 2,21; 1,6 e 2,05; 1,53 e 5,09; 2,75 e 3,03. Em todos os resultados foram observadas diferenças estatisticamente significantes (figuras 5 a 9). *C. glabrata* foi mais sensível a TFD aplicada com o LED em relação ao Laser e a maior redução foi verificada na 4^o aplicação.

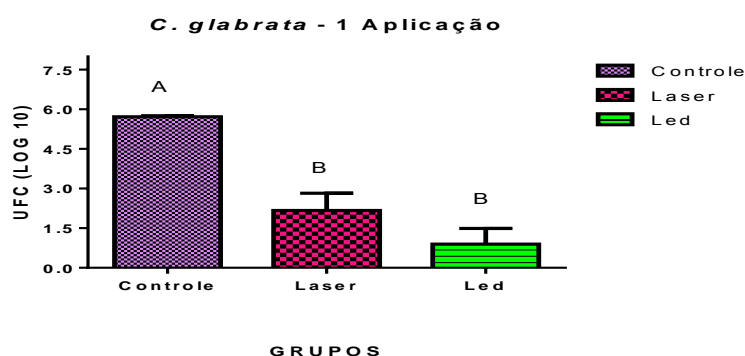


Figura 5 - Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. glabrata* submetidos a 1 aplicação com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado com o grupo controle com os demais grupos. Letras diferentes representam grupos heterogêneos.

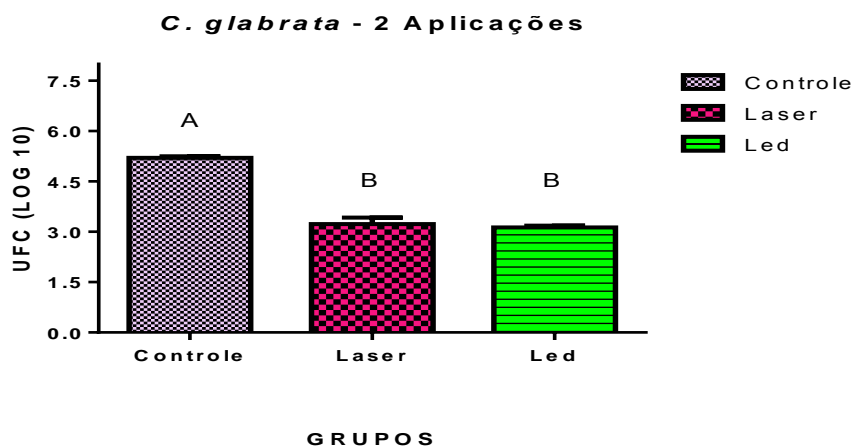


Figura 6 - Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. glabrata* submetidos a 2 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos. Letras diferentes representam grupos heterogêneos.

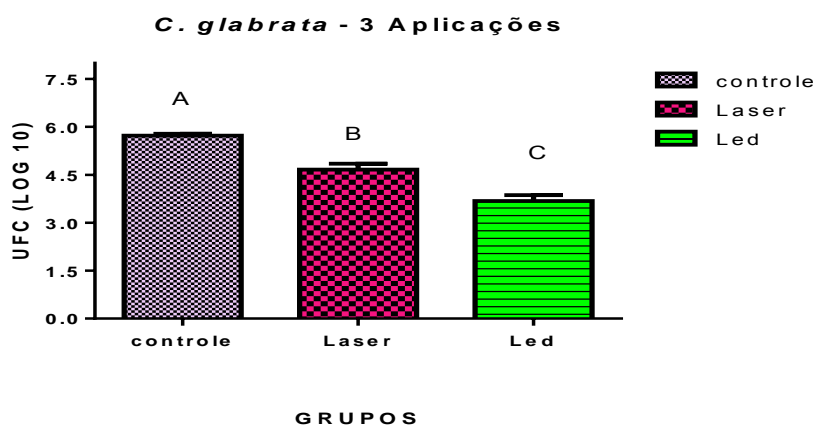


Figura 7 - Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. glabrata* submetidos a 3 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos. Letras diferentes representam grupos heterogêneos.

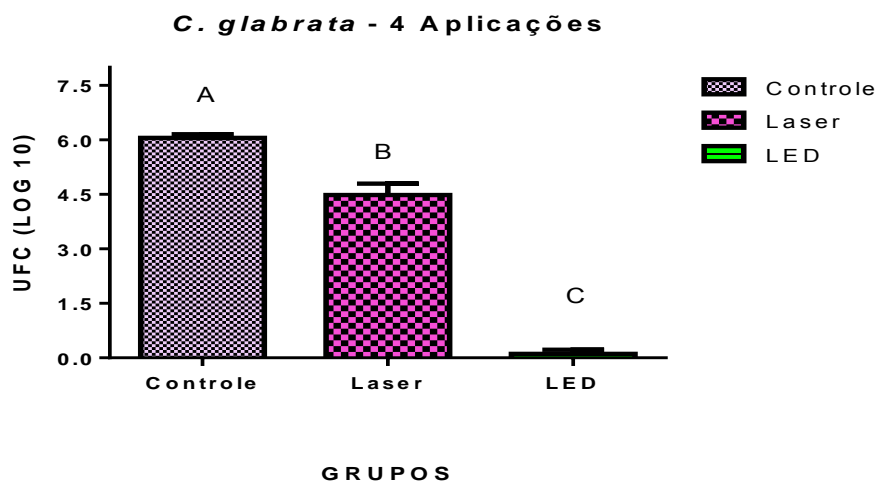


Figura 8 - Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. glabrata* submetidos a 4 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos. Letras diferentes representam grupos heterogêneos.

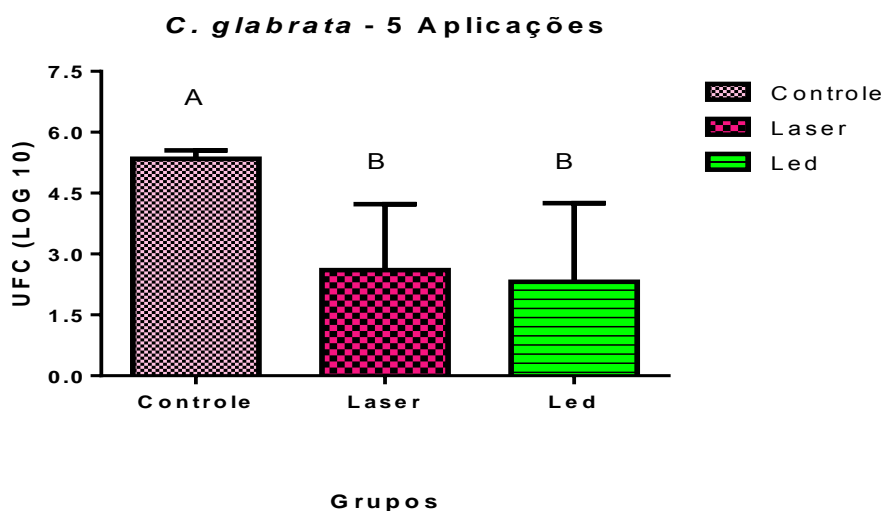


Figura 9 - Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. glabrata* submetidos a 5 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos. Letras diferentes representam grupos heterogêneos.

5.2 *Candida albicans*

Os resultados da redução de UFC em log comparada ao controle da primeira, segunda, terceira, quarta e quinta aplicações com o laser e com o LED foram respectivamente de 0,12 e 0,36; 0,54 e 0,93; 0,15 e 0,06; 0,96 e 0,75; 0,89 e 1,82. Na primeira aplicação a diferença estatística foi entre o controle e o led. Com duas e três aplicações não houve diferença estatística. Com quatro aplicações a diferença estatística mostrou-se entre o controle e os demais grupos. Na quinta aplicação houve diferença estatística entre todos os grupos. *C. albicans* apresentou maior sensibilidade a TFD aplicada com o LED em relação ao Laser e a maior redução foi verificada na 5ª aplicação. Pode-se observar as diferenças nas figuras de 10 a 14.

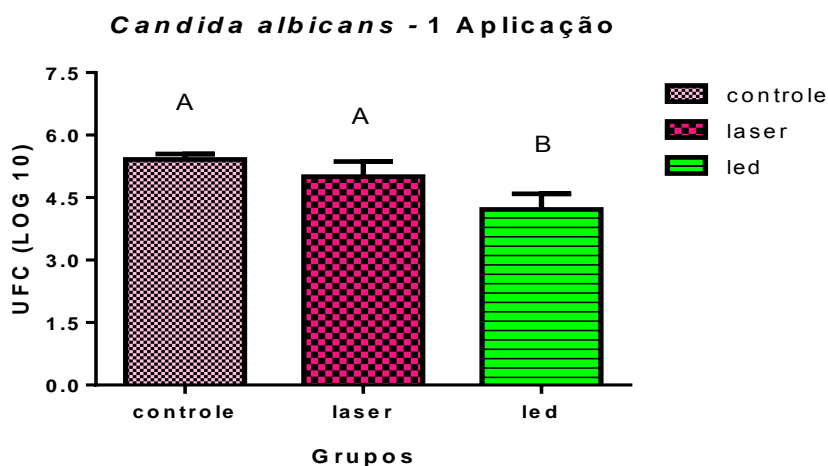


Figura 10 - Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. albicans* submetidos a 1 aplicação com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com o grupo tratado com Led e eritrosina. Letras diferentes representam grupos heterogêneos.

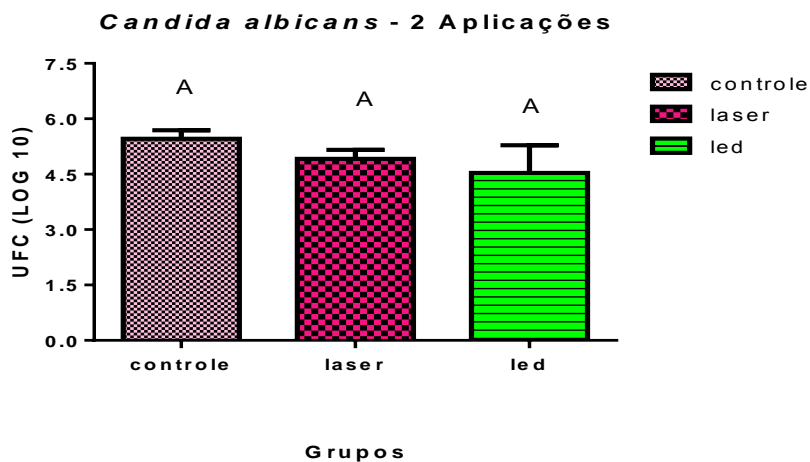


Figura 11 - Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. albicans* submetidos a 2 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Não houve diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos. Letras diferentes representam grupos heterogêneos.

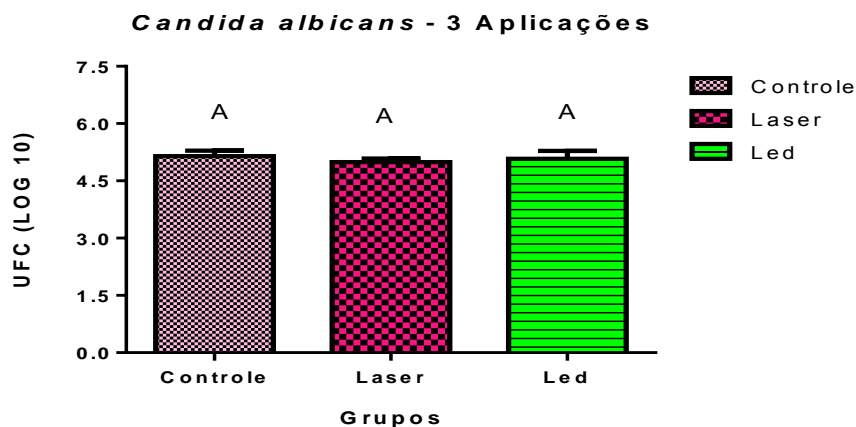


Figura 12 - Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. albicans* submetidos a 3 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Não houve diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos. Letras diferentes representam grupos heterogêneos.

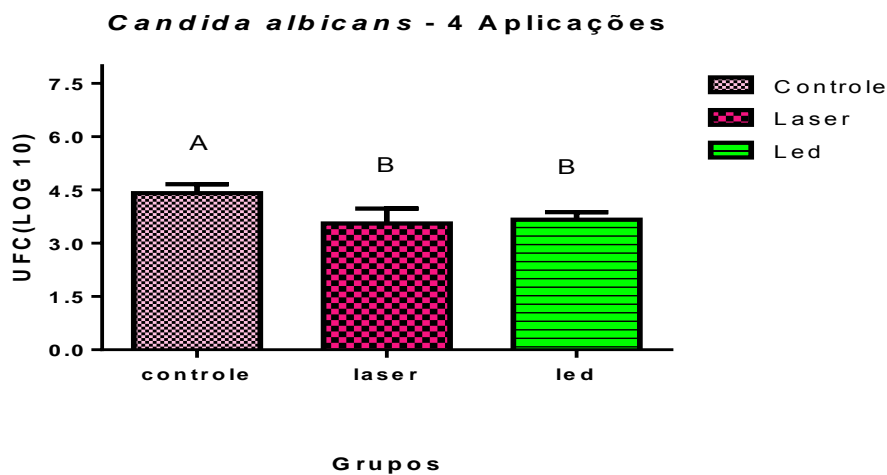


Figura 13- Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. albicans* submetidos a 4 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com o grupo tratado com Laser+azul de metileno e Led+eritrosina. Letras diferentes representam grupos heterogêneos.

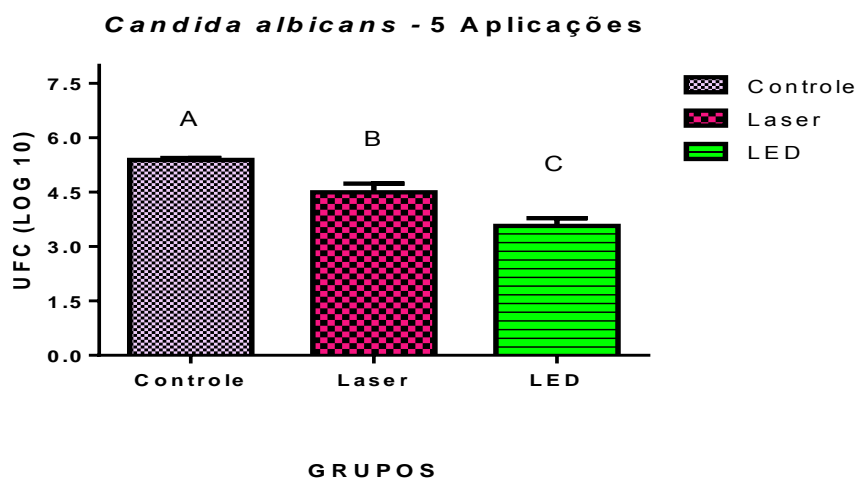


Figura 14- Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. albicans* submetidos a 5 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos.

5.3 *Candida tropicalis*

Os resultados da redução de UFC em log comparada ao controle da primeira, segunda, terceira, quarta e quinta aplicações com o Laser e com o LED foram respectivamente de 0,16 e 0,14; 1,52 e 2,84; 1,86 e 2,1; 1,81 e 2,39 e 0,86 e 1,36. Na primeira aplicação não foi observada diferença estatística. Com duas aplicações foram observadas diferenças estatísticas entre o controle e o LED. Com três aplicações houve diferença estatisticamente o controle em relação ao Laser e ao LED. Na quarta aplicação não houve diferença estatisticamente significativa. A 5ª aplicação apresentou diferença entre o controle e o LED. *C. tropicalis* foi mais sensível a TFD aplicada com o LED em relação ao Laser e a maior redução foi verificada na 2ª aplicação. As diferenças podem ser verificadas nas figuras de 15 a 19.

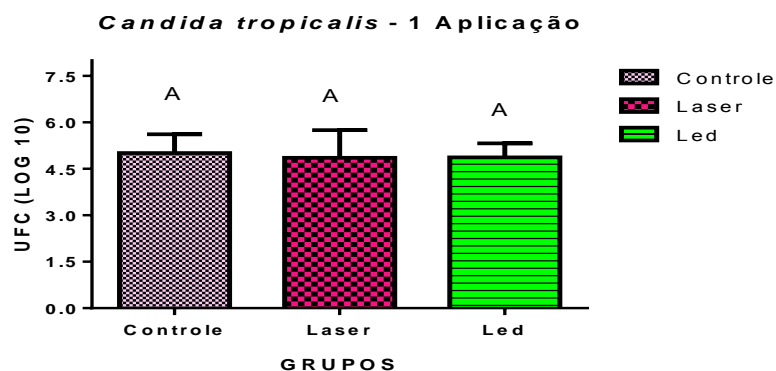


Figura 15- Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. tropicalis* submetidos a 1 aplicação com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Não houve diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos. Letras diferentes representam grupos heterogêneos.

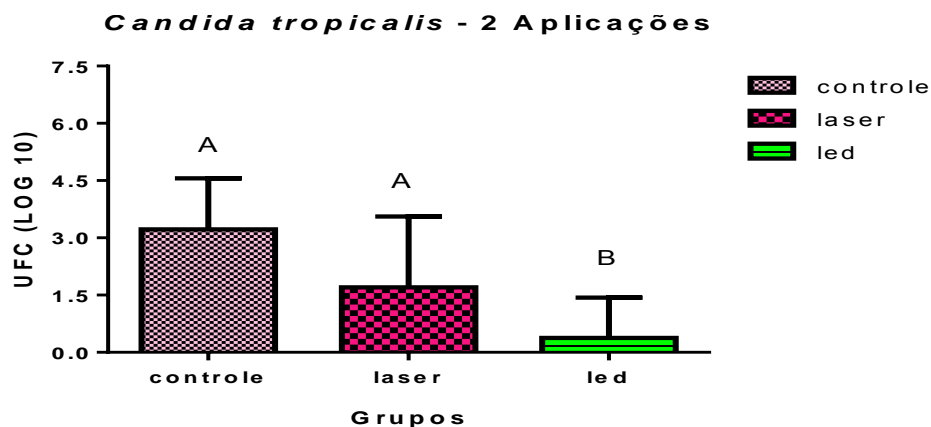


Figura 16- Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. tropicalis* submetidos a 2 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com o grupo Led e eritrosina. Letras diferentes representam grupos heterogêneos.

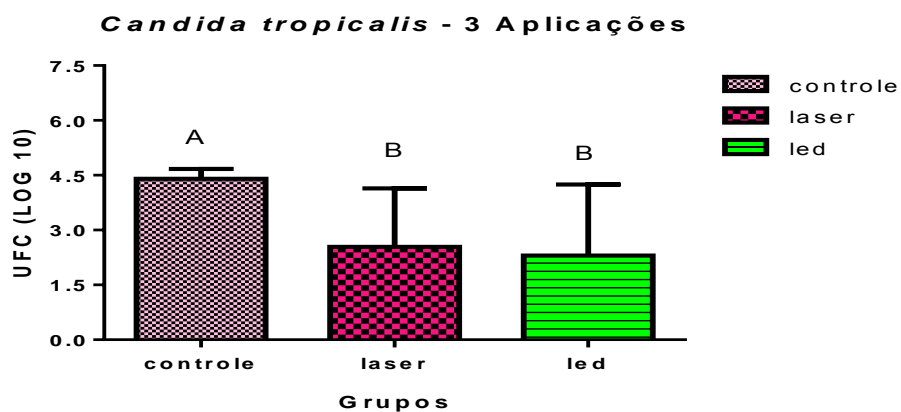


Figura 17- Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. tropicalis* submetidos a 3 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos. Letras diferentes representam grupos heterogêneos.

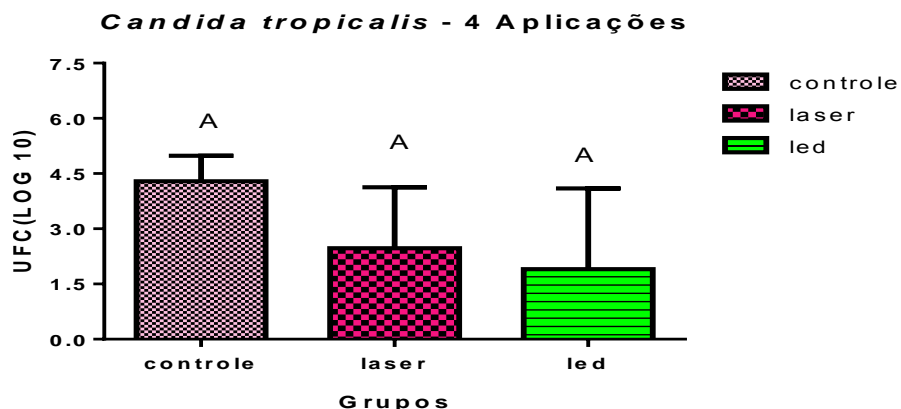


Figura 18- Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. tropicalis* submetidos a 4 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Não houve diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com os demais grupos. Letras diferentes representam grupos heterogêneos.

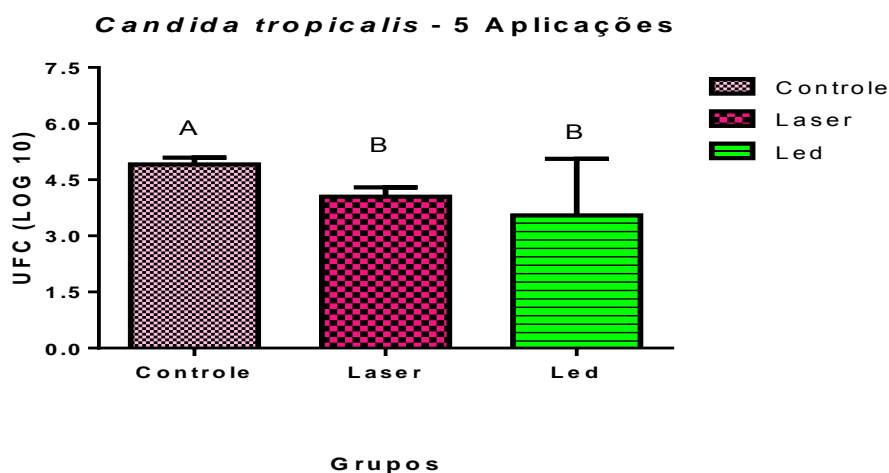


Figura 19- Valores das médias e desvios padrão em UFC/mL (Log) para os biofilmes de *C. tropicalis* submetidos a 2 aplicações com os tratamentos: NaCl como grupo controle, Laser e azul de metileno e LED e eritrosina. *Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P < 0,05$) quando comparado o grupo controle com o grupo Led e eritrosina. Letras diferentes representam grupos heterogêneos.

6 DISCUSSÃO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFD) tem sido usada para combater infecções locais, e consiste da combinação de um fotossensibilizador, uma fonte de luz e espécies reativas de oxigênio para matar as células microbianas (Scwingel et al., 2012). A terapia fotodinâmica antimicrobiana é uma alternativa terapêutica que está atualmente sob investigação para o controle e tratamento de infecções. Essa terapia baseia-se na utilização de moléculas de corante fotoativa, amplamente conhecido como fotossensibilizador. O fotossensibilizador, após irradiação com luz visível, produz espécies reativas de oxigênio que podem destruir a lipídios e proteínas, causando a morte celular (Chibebe et al., 2013a).

Uma ampla gama de micro-organismos já mostraram susceptibilidade à TFD. Portanto, esta terapia pode consistir em uma alternativa para tratamento de infecções fúngicas que é causada principalmente por biofilmes, desde que eles são mais resistentes aos antibióticos convencionais e podem desempenhar um papel nas infecções persistentes. Biofilmes são a principal causa de infecções microbianas nos seres humanos, representando assim um grave problema de saúde. *Candida albicans* é um fungo capaz de formar biofilmes, causando infecções superficiais da pele e mucosas, bem como micoses profundas, particularmente em pacientes imunocomprometidos. Nesses pacientes, infecções invasivas são frequentemente associadas com alta morbidade e mortalidade. Além disso, o aumento da resistência antifúngica diminuiu a eficácia das terapias convencionais. Além disso, os antifúngicas atuais

apresentam toxicidade para o hospedeiro. O uso de TFDA como um agente antimicrobiano tópico contra doenças superficiais e cutâneas representa um método eficaz para a eliminação de micro-organismos (Gonzales, Maisch, 2012).

O surgimento de cepas de *Candida* resistentes à antifúngicos tem motivado o estudo da TFD como uma alternativa de tratamento dessas infecções (Chibebe et al., 2013b). A várias décadas, o tratamento fotodinâmico tem sido relatado na literatura por ser eficaz na erradicação de vários micro-organismos, usando diferentes fotossensibilizadores, diferentes comprimentos de onda da luz e diferentes fontes de luz (Biel et al., 2010). Eficácia antimicrobiana de terapia fotodinâmica depende tanto do fotossensibilizador, como dos parâmetros do Laser (Khademi et al., 2014). Para realizar eficazmente PDT *in vivo* é necessário garantir que a luz atinja todo tecido doente. Isso envolve a compreensão de como a luz atinge vários tecidos e os efeitos relativos de absorção e espalhamento (Castano et al., 2004).

A atividade de diferentes fotossensibilizadores está relacionada às propriedades químicas e fotoquímicas, sendo que a eficácia antimicrobiana também depende da estrutura celular dos patógenos (Prates et al., 2013).

Azul de metileno é uma molécula que tem vindo a desempenhar papéis importantes na microbiologia e farmacologia. Tem sido amplamente utilizado para corar os organismos vivos, para tratar a Metahemoglobinemia, e ultimamente tem sido considerado como um fotossensibilizador para terapia fotodinâmica (Tardivo et al., 2005).

Teichert et al. (2002) avaliaram a eficácia do uso de azul de metileno mediada por terapia fotodinâmica para o tratamento de candidíase oral em um modelo murino de imunossuprimidos, imitando o que é encontrado em pacientes humanos. Setenta e cinco ratos com imunodeficiência combinada grave foram inoculados por via oral com *C. albicans* 3 vezes por semana durante um período de 4 semanas. No dia

do tratamento, era realizada uma coleta e cultivo de micro-organismos. Era administrada topicamente na cavidade oral solução 0,05 mL de azul de metileno em uma das seguintes concentrações: 250, 275, 300, 350, 400, 450 ou 500 µg/mL. Após 10 min, os ratos eram tratados com 664 nm de diodo laser com um difusor cilíndrico. Após a terapia fotodinâmica, era feita a cultura dos micro-organismos e os ratos eram sacrificados. Os resultados indicaram um efeito dose-dependente do fotossensibilizador. Concentrações de 250 a 400 µg/mL reduziram o crescimento de fungos, mas não eliminaram *C. albicans*. Concentrações de MB de 450 e 500 µg/mL erradicaram totalmente *C. albicans* da cavidade oral. Estes resultados sugerem que a terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno pode ser usada para tratar a candidíase oral em pacientes imunodeficientes.

Costa et al. (2011) avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica em culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans* e *C. dubliniensis* mediada por eritrosina e LED. Culturas planctônicas de suspensões padronizadas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* foram tratados com eritrosina na concentração 0,39-200 µM e LED em uma placa de microtitulação de 96 poços. Biofilmes formados por esses micro-organismos no fundo de placa de microtitulação de 96 poços foram tratados com 400 µM de eritrosina e LED. Após PDT, os biofilmes foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O efeito antimicrobiano da PDT contra culturas planctônicas e biofilmes foi verificado pela contagem de unidades formadoras de Colônia (UFC/mL). *C. albicans* e *C. dubliniensis* não foram detectáveis após PDT das culturas planctônicas com concentrações de eritrosina 3.12 µM ou superior. Os valores de UFC/mL obtidos de biofilmes foram reduzidos 0,74 log₁₀ para *C. albicans* e 0,21 log₁₀ para *C. dubliniensis*. Com isso concluíram que *C. albicans* e *C. dubliniensis* foram susceptíveis a PDT mediada pela eritrosina e LED, mas os biofilmes de ambas as espécies de *Candida* foram mais resistentes do que suas contrapartes planctônicas.

Em outro estudo Costa et al. (2012a), avaliaram os efeitos da terapia fotodinâmica usando o Rosa Bengala ou eritrosina com luz emitida por diodo (LED) em culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans*. Sete cepas clínicas e uma cepa padrão (ATCC 18804) de *C. albicans* foram utilizadas. Culturas planctônicas e biofilmes de cada cepa de *C. albicans* foram submetidas às seguintes condições experimentais: (a) tratamento com Rosa Bengala e LED (RBL); (b) tratamento com eritrosina e LED (EL); e o grupo controle (c), sem tratamento de irradiação LED ou fotossensibilizador (P-L-). Após irradiação de culturas planctônicas e biofilmes, as culturas foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (37 °C em 48 h) para a contagem de unidades formadoras de Colônia (UFC/ml(-1)). Os biofilmes foram analisados utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados revelaram uma redução significativa das culturas planctônicas (3,45 log₁₀ e 1,97 log₁₀) e de biofilmes (1 log₁₀) para culturas que foram submetidos a PDT usando eritrosina ou Rosa Bengala, respectivamente. Os dados revelaram que PDT foi eficaz na redução e destruição das hifas e blastoconídios de *C. albicans*. Os resultados mostram que a PDT mediada por eritrosina e Rosa Bengala com irradiação LED é eficaz no tratamento de *C. albicans*.

No presente estudo foram utilizados o laser de Arseneto de Gálio e Alumínio com comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível) associado ao fotossensibilizador azul de metileno na concentração 300 µM e Diodo Emissor de Luz (LED) de cor verde com comprimento de onda de 532 nm associado a eritrosina na concentração de 400 µM. Os comprimentos de onda de ambos correspondem à faixa de comprimento de alta absorção dos fotossensibilizadores azul de metileno e eritrosina respectivamente.

No estudo de Scwingel et al. (2012) vinte e um pacientes infectados pelo HIV foram divididos em três grupos. Grupo controle foi tratado com a medicação convencional para candidíase (fluconazol 100 mg/dia durante 14 dias). Grupo laser foi submetido a terapia a laser de

baixa intensidade e grupo TFD foi tratado com laser de baixa potência e azul de metileno. Os resultados mostraram que fluconazol foi eficaz, no entanto, isso não impediu o retorno da candidíase em curto prazo. Laserterapia em si não mostrou qualquer redução de *Candida* spp. e TFD erradicou colônias desse fungo nos pacientes e não apareceu a recorrência da candidíase em 30 dias após a irradiação.

No estudo desenvolvido por Mima et al. (2011b) cinco indivíduos com diagnóstico clínico e microbiológico com estomatite protética foram submetidos a 6 sessões de PDT 3 vezes por semana durante 15 dias. Em cada sessão, próteses dos pacientes foram pulverizadas com 500 mg/L Photogem e após 30 minutos de incubação, foram irradiados por fonte luminosa do diodo emissor de luz. Culturas de *Candida* spp. das próteses foram realizadas no dia 0, no final do tratamento (dia 15) e em intervalos de tempo de seguimento (dias 30 e 60). Quatro pacientes apresentaram resolução clínica de estomatite protética (sem inflamação) após sessões de PDT, e apenas um demonstrou redução na inflamação palatal. Recorrência de estomatite protética foi observada em 2 pacientes durante o período de estudo. Com isso concluíram que PDT parece ser uma alternativa de tratamento para estomatite protética.

Mima et al. (2011a) testaram cepas de referência de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. krusei*. Para esse estudo foram confeccionadas trinta e quatro próteses em um procedimento padronizado e submetidas a esterilização por óxido de etileno. A prótese era individualmente inoculada com uma das cepas de *Candida* e incubada a 37 °C por 24 h. Próteses enviadas para PDT eram individualmente pulverizadas com 50 mg/L de Photogem® e após 30 min, iluminada por luz LED por 26 min (37,5 J/cm²). Para todas as espécies de *Candida*, a PDT resultou em redução significativa de UFC/mL. Concluíram que PDT foi um método eficaz para redução de *Candida* spp. em próteses.

O biofilme de *C. glabrata* submetido à TFD demonstrou expressiva redução da viabilidade das células com diferença estatisticamente

significante desde a primeira aplicação com o LED e eritrosina, apresentando maior redução na quarta aplicação, onde a redução em log foi de 5,09. Na TFD realizada com o laser e azul de metileno neste mesmo micro-organismo a maior redução foi observada na primeira aplicação onde a redução em Log foi de 3,55.

Os dados obtidos neste trabalho alcançaram maior redução microbiana no biofilme formado por *C. glabrata* com quatro aplicações de TFD na concentração de 400 µM da eritrosina irradiada pelo LED (42,635 J/cm²) luz verde por 3 min. A maior redução microbiana observada na TFD mediada pelo fotossensibilizador azul de metileno foi na concentração de 300 µM irradiado pelo laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (20 J/cm²) de emissão de luz vermelha visível por 7 min e 8 s.

Dovigo et al. (2011a) obtiveram inativação completa de *Candida*, quando utilizaram LED de emissão de luz azul (37,5 J.cm-2) associado ao fotossensibilizador Photogen® (25 mg/L) em culturas planctônicas de cepas padrão e cepas resistentes ao fluconazol de *C. albicans* e *C. glabrata*.

Os resultados obtidos neste trabalho com a aplicação da TFD sobre biofilme formado *in vitro* de *C. albicans* mostrou que com uma aplicação houve diferença estatística apenas entre os grupos controle e Led. Com duas e três aplicações não verificamos diferença estatística entre os grupos. A diferença estatística apareceu entre todos os grupos com cinco aplicações. Na concentração de 300 µM do azul de metileno e irradiado pelo laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (20 J/cm²) de emissão de luz vermelha visível por 7 min e 8 s a redução em Log foi de 0,89. Salientando que *C. albicans* apresentou maior susceptibilidade a TFD irradiada pelo LED (42,635 J/cm²) luz verde por 3 min e concentração de 400 µM da eritrosina, mostrando redução de 1,82 Log.

Mima et al. (2012) realizaram um ensaio clínico onde a eficácia da terapia fotodinâmica foi comparada com a terapia antifúngica tópica para o tratamento da estomatite protética e a prevalência das espécies de

Candida foi identificada. Os pacientes foram aleatoriamente divididos em 2 grupos. Um grupo de pacientes recebeu tratamento tópico com nistatina 4 vezes diariamente por 15 dias e no grupo da terapia fotodinâmica, a prótese e o palato dos pacientes foram pulverizadas com 500 mg/L de Photogem® e após 30 min de incubação, era iluminado pela luz de diodo emissor de luz em 455 nm (37,5 e 122 J/cm², respectivamente) 3 vezes por semana durante 15 dias. Culturas de microorganismos foram realizadas a partir de próteses e palatos, no final do tratamento (dia 15). Colônias foram quantificadas (UFC/mL) e identificadas por testes bioquímicos. Ambos os tratamentos reduziram significativamente a UFC/mL. *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente identificada. TFD foi tão eficaz quanto nistatina tópica no tratamento da estomatite protética.

No estudo de Costa et al. (2011) que avaliou a ação antifúngica da TFD em culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans* formados *in vitro* e em modelo de candidose experimental em camundongos a TFD reduziu *in vitro* 0,74 log₁₀ de *C. albicans* com redução de leveduras e hifas verificada por MEV. *In vivo*, ocorreu redução de *C. albicans* de 0,73 log₁₀ e 35% de aderência às células epiteliais bucais, porém não houve redução significativa das lesões macroscópicas e histológicas.

Dovigo et al. (2010) avaliaram *in vitro* susceptibilidade de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* a terapia fotodinâmica induzida por Photogem® e LED. Suspensões de cada cepa foram tratadas com três concentrações de fotossensibilizador (10, 25 e 50 mg/L) e expostas a fluências de luz LED de 18, 25,5 e 37,5 J/cm² ($\lambda \sim 455$ nm). Suspensões de controle foram tratadas apenas com concentrações de fotossensibilizador apenas expostas para as fluências de luz LED ou não expostas a luz do LED ou fotossensibilizador. De cada amostra, obtiveram-se diluições em série e alíquotas foram semeadas em ágar Sabouraud Dextrose. Após a incubação das placas (37 °C por 48 h), colônias foram contadas (UFC/mL) e os dados foram analisados

estatisticamente pela ANOVA e teste de Tukey. A eliminação de *C. albicans* foi observada em 18 J/cm² em associação com 50 mg/L de fotossensibilizador. *C. dubliniensis* foram inativadas com 18 J/cm² usando 25 mg/L do fotossensibilizador. A inativação de *C. tropicalis* foi observada após fotossensibilização 25 mg/L e iluminação subsequente em 25.5 J/cm². Para *C. krusei*, nenhuma das associações entre o fotossensibilizador e luz resultou na morte completa desta espécie. PDT provou ser eficaz para a inativação de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*.

Quando aplicada a TFD sobre os biofilmes formados por *C. tropicalis* foi observada diferenças estatísticas entre os grupos controle e o Led na segunda aplicação sendo esta também a que *C. tropicalis* apresentou maior redução microbiana com a TFD aplicada com o LED e eritrosina. Na terceira aplicação houve diferença estatística entre o controle em relação ao Laser e ao Led. Na quinta aplicação apresentou diferença entre o controle e o Led.

Assim, verificou-se que a TFD foi eficaz para reduzir os biofilmes formados *in vitro* por *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, apresentando efeito potencial para tratamento da estomatite protética.

A terapia fotodinâmica tem o potencial de um tratamento eficaz para difícil erradicação de infecções fúngicas das regiões acessíveis do corpo. Existe a perspectiva de erradicação da candidíase oral em um paciente com estomatite protética (Donnelly et al., 2008). Em experimentos *in vitro*, TFD apresenta efeito antimicrobiano contra *Candida*, no entanto, em estudos clínicos a TFD antimicrobiana é uma potente estratégia terapêutica para infecções fúngicas orais, mas requer mais investigações (Javed et al., 2014).

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- a) A terapia fotodinâmica em múltiplas sessões, medida pelo Laser e pelo Led foram efetivas quanto a redução em Log de biofilmes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* formados *in vitro*;
- b) *C. glabrata* foi a espécie de Candida que apresentou maior susceptibilidade a terapia fotodinâmica;
- C) Para todos os micro-organismos a maior redução microbiana observada foi alcançada com a TFD mediada pelo Led e eritrosina em relação a TFD com Laser e azul de metileno.

8 REFERÊNCIAS *

Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*. 2006 Aug;55(8):999-1008.

Alfenas CF, Santos MFL, Takehara GNM, Paula MVQ. Photodynamic therapy in the reduction of microorganisms in the root canal system. *Rev Bras Odontol*. 2011 Jan-Jun;68(1):68-71.

Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs CJH, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004 May;1(1):27-42. doi: 10.1016/S1572-1000(04)00007-9.

Andrade OPB, Junqueira JC, Faria IS, Santos SSF, Rego MA, Jorge AOC. Efeitos do vinagre sobre *Candida albicans* aderidas *in vitro* em resina acrílica termicamente ativada. *Cienc Odontol Bras*. 2008 Jan/Mar;11(1):91-8.

Arendrup MC. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jun;20(6):42-8. doi: 10.1111/1469-0691.12513.

Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005 Apr 1;10(1):E27-39

Balata ML, Ribeiro ÉDP, Bittencourt S, Tunes UR. Terapia fotodinâmica como adjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico. *R Periodontia*. 2010;20(2):22-32.

Barnett JA. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeast*. 2008 Jun;25(6):385-417. doi: 10.1002/yea.1595.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample eferences [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c200 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Bencharit S, Altaraeneh SK, Baxter SS, Carlson J, Ross GF, Border MB, et al. Elucidating role of salivary proteins in denture stomatitis using a proteomic approach. *Mol BioSyst.* 2012;8(12):3216–23.

Bhattacharyya S, Gupta P, Banerjee G, Jain A, Singh M. *IN-vitro* Inhibition of Biofilm Formation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by Heat Stable Compounds in Culture Filtrate of *Aspergillus flavus*. *J Clin Diagn Res.* 2013 Oct;7(10):2167-9. doi: 10.7860/JCDR/2013/6020.3460.

Biel MA. Photodynamic therapy of bacterial and fungal biofilms infections. *Methods Mol Biol.* 2010;635:175-94. doi: 10.1007/978-1-60761-697-9_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 Jan;5(1):56-65.

Carneiro VSM, Catão MCHV. Photodynamic therapy applications in dentistry. *FOL • Faculdade de Odontologia de Lins/Unimep.* 2012 Jan-Jun;22(1):25-32.

Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* Dec 2004;1(4):279–93. doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4.

Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Mitra S, Haidaris CG. Respiratory deficiency enhances the sensitivity of the pathogenic fungus *Candida* to photodynamic treatment. *Photochem Photobiol.* 2008 Sep-Oct;84(5):1141-8.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilmformation the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001 Sep;183(18):5385-94.

Chen YL, Yu SJ, Huang HY, Chang YL, Lehman VN, Silao FG, et al. Calcineurin controls hyphal growth, virulence, and drug tolerance of *Candida tropicalis*. *Eukaryot Cell.* 2014 Jul;13(7):844-54. doi: 10.1128/EC.00302-13.

Chibebe JuniorJ, Fuchs BB, Sabino CP, Junqueira JC, Jorge AO, Ribeiro MS, et al. Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. *PLoS One.* 2013a;8(2):e55926. doi: 10.1371/journal.pone.0055926.

Chibebe Junior J, Sabino CP, Tan X, Junqueira JC, Wang Y, Fuchs BB, et al. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. *BMC Microbiol.* 2013b Oct 1;13:217. doi: 10.1186/1471-2180-13-217.

Coronado-Castellote L, Jiménez-Soriano Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent.* 2013;5(5):279-86.

Costa AC, Rasteiro VM, Pereira CA, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. The effects of rose bengal and erythrosine mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. *Mycoses.* 2012a Jan;55(1):56-63. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02042.x.

Costa AC, Rasteiro VMC, Hashimoto ESS, Araújo CF, Pereira CA, Junqueira JC, et al. Effect of erythrosine and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012b Jul;114(1):67-74. doi: 10.1016/j.oooo.2012.02.002.

Costa ACBP, Rasteiro VMC, Pereira CA, Hashimoto ESS, Beltrame-Junior M, Junqueira JC, et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine and LED-mediated photodynamic therapy. *Arch Oral Biol.* 2011;56(11):1299-305.

Costa C, Pires C, Cabrito TR, Renaudin A, Ohno M, Chibana H, et al. *Candida glabrata* drug:H⁺ antiporter CgQdr2 confers imidazole drug resistance, being activated by transcription factor CgPdr1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jul;57(7):3159-67. doi: 10.1128/AAC.00811-12.

Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, St Denis TG, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol.* 2012 Apr 10;3:120.

Dalwai S, Rodrigues SJ, Baliga S, Shenoy VK, Shetty TB, Pai UY, et al. Comparative evaluation of antifungal action of tea tree oil, chlorhexidine gluconate and fluconazole on heat polymerized acrylic denture base resin - an in vitro study. *Gerodontology.* 2014 Dec 19. doi: 10.1111/ger.12176.

Dantas APFM, Consani RLX, Sardi JCO, Mesquita MF, Silva MCVS, Sinhorette MAC. Biofilm formation in denture base acrylic resins and disinfection method using microwave. *J Res Practice Dent.* 2014. Article ID 112424, DOI: 10.5171/2014.112424.

Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, David Woolfson A. 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*. 2007 Jan 3;86(1):59-69.

Dosselli R, Ruiz-González R, Moret F, Agnolon V, Compagnin C, Mognato M, et al. Synthesis, spectroscopic and photophysical characterization and photosensitizing activity toward prokaryotic and eukaryotic cells of porphyrin-magainin and buforin conjugates *J Med Chem*. 2014 Feb 27;57(4):1403-15. doi: 10.1021/jm401653r.

Dovigo LN, Carmello JC, Carvalhoc MT, Mimab EG, Vergani CE, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. *Biofouling*. 2013;29(9):1057-67.

Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EGO, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*. 2011a Mar;54(2):123-30. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01769.x.

Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, Adriano CS, Bagnato VS. Photodynamic inactivation of four *Candida* species induced by photogem®. *Braz J Microbiol*. 2010 Jan;41(1):42-9. doi: 10.1590/S1517-83822010000100009.

Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med*. 2011b Nov;43(9):927-34.

Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):155-66.

Fallahi AA, Korbacheh P, Zaini F, Mirhendi H, Zeraati H, Noorbakhsh F, et al. *Candida* species in cutaneous candidiasis patients in the Guilan Province in Iran; Identified by PCR-RFLP Method. *Acta Med Iran*. 2013;51(11):799-804.

Falsetta ML, Koo H. Beyond Mucosal Infection: a Role for *C. albicans* streptococcal interactions in the pathogenesis of dental caries. *Curr Oral Health*. 2014 Mar;(1):86-93.

Farah CS, Lynch N, McCullough MJ. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust Dent J*. 2010 Jun;55(1):48-54. doi: 10.1111/j.1834-7819.2010.01198.x.

Flevari A, Theodorakopoulou M, Velegraki A, Armaganidis A, Dimopoulos G. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. *Clin Interv Aging*. 2013;8:1199-208. doi: 10.2147/CIA.S39120.

Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*. 2005 Jan;13(1):34-40.

Ganapathy DM, Joseph S, Ariga P, Selvaraj A. Evaluation of the influence of blood glucose level on oral candidal colonization in complete denture wearers with type 2 diabetes mellitus: an in vivo study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2013 Jan;10(1):87-92. doi: 10.4103/1735-3327.111806.

Goiato MC, Luciana Castelleone L, Santos DM, Gennari Filho H, Assunção WG. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2005 Jan-Abr;5(1):85-90.

Golecka M, Mierzwińska-Nastalska E, Ołdakowska-Jedynak U. Influence of oral hygiene habits on prosthetic stomatitis complicated by mucosal infection after organ transplantation. *Transplant Proc*. 2007 Nov;39(9):2875-8.

Golecka M, Ołdakowska-Jedynak U, Mierzwin Nastalska E, Adamczyk-Sosinska E. Candida-associated denture stomatitis in patients after immunosuppression therapy. *Transplant Proc*. 2006 Jan-Feb;38(1):155-6.

Gonzales FP, Maisch T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biol*. 2012 Jan;116(1):1-10. doi: 10.1016/j.funbio.2011.10.001.

Guinea J, Zaragoza Ó, Escribano P, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Sánchez-Reus F, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia Collected in a population-based study in Spain from 2010 to 2011. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(3):1529-37. doi: 10.1128/AAC.02155-13.

Güzel AB, Aydin M, Meral M, Kalkanci A, Ilkit M. Clinical characteristics of Turkish women with *Candida krusei* vaginitis and antifungal susceptibility of the *C. krusei* isolates. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2013;2013:698736. doi: 10.1155/2013/698736.

Hadjieva H, Dimova M, Todorov S. Stomatitis prothetica-A polyetiologic disorder. *J IMAB*. 2006;12(2):38-41.

Haidaris CG, Foster TH, Waldman DL, Mathes EJ, McNamara J, Curran T. Effective photodynamic therapy against microbial populations in human

deep tissue abscess aspirates. *Lasers Surg Med*. 2013 Oct;45(8):509-16. doi: 10.1002/lsm.22171.

Hancock V, Ferrières L, Klemm P. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 Feb;267(1):30-7.

Hawser SP, Baillie GS, Douglas JL. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*. 1998 Mar;47(3):253-6.

Holmes AR, Rodrigues E, Weilen PVD, Lyons KM, Haigh B, Wheeler TT, et al. Adherence of *Candida albicans* to silicone is promoted by the human salivary protein SPLUNC2/PSP/BPIFA2. *Mol Oral Microbiol*. 2014 Apr;29(2):90-8. doi: 10.1111/omi.12048.

Issa MCA, Manela-Azulay M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. *An Bras Dermatol*. 2010;85(4):501-11.

Jackson BE, Wilhelmus KR, Mitchell BM. Genetically regulated filamentation contributes to *Candida albicans* virulence during corneal infection. *Microb Pathog*. 2007 Feb-Mar;42(2-3):88-93.

Javed F, Lakshman P, Samaranayake LP, Romanos GE. Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: a systematic review of currently available evidence. *Photochem Photobiol Sci*. 2014 May;13(5):726-34. doi: 10.1039/c3pp50426c.

Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol*. 2004 Oct;49(10):789-98.

Johnson LR. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *J Theor Biol*. 2008 Mar 7;251(1):24-34.

Jorge AOC, Juqueira JC, Romero MM, Martins CAP. Sensibilidade às toxinas *killer* de espécies de *candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes com candidose e de indivíduos normais. *Rev Odontol UNESP*. 2000 Jan-Dez;29(1/2):71-80.

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 Out-Dez;11(4):279-85.

Jorge AOC. *Microbiologia Bucal*. São Paulo: Santos; 2007. 198p.

Jorge AOC. Princípios de microbiologia e imunologia. São Paulo: Santos; 2006. 418p.

Jorge AOC. Microbiologia e imunologia geral. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. 352p.

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(5):468-81.

Junqueira JC, Martins JS, Faria RL, Colombo CED, Jorge AOC. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci*. 2009;24(6):877-84.

Junqueira JC, Ribeiro MA, Rossoni RD, Barbosa JO, Querido SM, Jorge AO. Antimicrobial photodynamic therapy: photodynamic antimicrobial effects of malachite green on *Staphylococcus*, enterobacteriaceae and *Candida*. *Photomed Laser Surg*. 2010 Aug;2(1):67-72.

Junqueira JC. Models hosts for the study of oral candidiasis. *Adv Exp Med Biol*. 2012;710:95-105.

Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, George P, Tegos GP, et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces *in vivo* pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):445-51.

Khademi H, Torabinia N, Allameh M, Jebreilamtigh HR. Comparative evaluation of photodynamic therapy induced by two different photosensitizers in rat experimental candidiasis. *Dent Res J (Isfahan)*. 2014 Jul-Aug;11(4):452-9.

Li F, Svarovsky MJ, Karlsson AJ, Wagner JP, Marchillo K, Oshel P, et al. Eap1p, an Adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. *Eukaryot Cell*. 2007 Jun;6(6):931-9.

Linares CE, Giacomelli SR, Altenhofen D, Alves SH, Morsch VM, Schetinger MR. Fluconazole and amphotericin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Rev Soc Bras Med*. 2013 Nov-Dec;46(6):752-8.

Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química nova*. 2000;23(2):237-43.

Maciel SSSV, Souza RSV, Donato LMA, Albuquerque IGM, Donato LFA. Prevalência das lesões de tecidos moles causadas por próteses removíveis. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2008 Jan-Abr;8(1):93-7.

Malik R, Manocha A, Suresh DK. Photodynamic therapy - A strategic review. *Indian J Dent Res*. 2010;21(2):285-91.

Martins CAP, Santos SSF, Loberto JCS, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Presença *Candida* spp. em pacientes com periodontite crônica. *Cienc Odontol Bras*. 2002 Set-Dez;5(3):75-83.

Martins JS, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CE, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Jan;111(1):71-7.

McManus BA, Coleman DC. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infect Genet Evol*. 2014 Jan;21:166-78. doi: 10.1016/j.meegid.2013.11.008.

Melo NR, Abdrahman A, Greig C, G, Mukherjee K, Thornton C, Ratcliffe NA, et al. Myriocin significantly increases the mortality of a non-mammalian model host during *Candida* pathogenesis. *PLoS One*. 2013 Nov 15;8(11). e78905. doi: 10.1371/journal.pone.0078905.

Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Mar;109(3):392-401.

Mima EG, Pavarina AC, Ribeiro DG, Dovigo LN, Vergani CE, Bagnato VS. Effectiveness Of Photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* spp. On dentures: in vitro study. *Photomed Laser Surg*. 2011a Dec;29(12):827-33. doi: 10.1089/pho.2011.3022.

Mima EG, Pavarina AC, Silva MM, Ribeiro DG, Vergani CE, Kurachi C, et al. Denture stomatitis treated with photodynamic therapy: Five cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011b Nov;112(5):602-8. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.05.019.

Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of photodynamic therapy conventional antifungal for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clinic Microbiol Infec*. 2012 Oct;18(10):380-8.

Mishra NN, Ali S, Shukla PK. Arachidonic acid affects biofilm formation and PGE2 level in *Candida albicans* and non-*albicans* species in presence of subinhibitory concentration of fluconazole and terbinafine. *Braz J Infect Dis.* 2014 May-Jun;18(3):287-93. doi: 10.1016/j.bjid.2013.09.006.

Moralez ATP, França EJJ, Furlaneto-Maia L, Quesada RMB, Furlaneto MC. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. *Med Mycol.* 2014 Jan;52(1):106-14. doi: 10.3109/13693786.2013.825822.

Moreira ACA, Falcão AFP, Andrade AP, Souza ER. Isolation of *Candida parapsilosis* in a patient with clinic diagnosis of chronic atrophic candidiasis. *Rev Ciên Méd Biol Salvador.* 2002 Nov;1(1):124-8.

Moreira JB, Birman EG, Cury AE. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 2000;13(4):343-8.

Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2007 Feb;115(1):77-80.

Nagao Y, Hashimoto K, Satã M. Candidiasis and other oral mucosal lesions during and after interferon therapy for HCV-related chronic liver diseases. *BMC Gastroenterol.* 2012 Nov 2;12:155. doi: 10.1186/1471-230X-12-155.

Navarro RS, Eduardo CP, Zezel DM, Ribeiro MS. Terapia fotodinâmica no restaurador atraumático. In: *Imparato JCP. Tratamento restaurador atraumático (ART): técnica de minha intervenção para o tratamento da doença cárie dentária.* Curitiba: Editora Maio;2005. p. 339-59.

Newton AV. Denture sore mouth a possible etiology. *Br Dent J.* 1962;112:357-60.

Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology.* 2010 Feb;98(1):15-25.

Nowis D, Makowski M, Stokłosa T, Legat M, Issat T, Gołab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(2):339-52.

Oliveira TRCC, Frigerio MLMA, Yamada MCM, Birman EG. Avaliação da estomatite protética em portadores de próteses totais. *Pesqui Odontol Bras.* 2000 Jul-Set;14(3):219-24.

Paz-Cristobal MP, Royo D, Rezusta A, Andrés-Ciriano E, Alejandre MC, Meis JF, et al. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. *Mycoses*. 2014 Jan;57(1):35-42. doi: 10.1111/myc.12099.

Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an *in vitro* study. *Lasers Med Sci*. 2011 May;26(3):341-8.

Perussi RJ. Photodynamic Inactivation of microorganisms. *Quím Nova*. 2007;30(4):988-94.

Prates RA, Fuchs BB, Mizuno K, Naqvi Q, Kato IT, Ribeiro MS, et al. Effect of virulence factors on the photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*. 2013;8(1):e54387.

Prazynska M, Gospodarek E. In Vitro Effect of Amphotericin B on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* Biofilm Formation. *Mycopathologia*. 2014 Feb;177(1-2):19-27. doi: 10.1007/s11046-014-9727-7.

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* Biofilms: an Update. *Eukaryotic Cell*. 2005 Apr;4(4):633-8.

Ramos IC, Vasconcelos LS, Lima MC, Figueiredo RQ. Candidose Bucal em pacientes HIV-positivos. *JBC J Bras Odontol Clín*. 1999;3(13):59-61.

Ricicova M, Kucharikova S, Tournu H, Hendrix J, Bujdakova H, Eldere JV, et al. *Candida albicans* biofilm formation in a new *in vivo* rat model. *Microbiology*. 2010;156(3):909-19.

Rosato A, Piarulli M, Schiavone BP, Catalano A, Carocci A, Carrieri A, et al. *In vitro* effectiveness of anidulafungin against *Candida* spp. biofilms. *J Antibiot (Tokyo)*. 2013 Dec;66(12):701-4. doi: 10.1038/ja.2013.83.

Sajith KG, Dutta AK, Sahni RD, Esakimuthu S, Chacko A. Is empiric therapy with fluconazole appropriate for esophageal candidiasis? *Indian J Gastroenterol*. 2014 Mar;33(2):165-8. doi: 10.1007/s12664-013-0439-6.

Sakki TK, Knuuttila ML, Läärä E, Anttila SS. The association of yeasts and denture stomatitis with behavioral and biologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997;84(6):624-9.

Scarlecio M, Valente T, Israel MS, Ramos ME. Estomatite protética versus candidíase: diagnóstico e tratamento. RGO, Porto Alegre. 2007 Out-Dez;55(4):395-8.

Scherma AP, Santos DVO, Jorge AOC, Rocha RF. Presença de *Candida* spp. na cavidade bucal de lactentes durante os primeiros quatro meses de vida. Cienc Odontol Bras. 2004 Jul-Set;7(3):79-86.

Schneider M, Kirfel G, Berthold M, Frentzen M, Krause F, Braun A. The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model. Lasers Med Sci. 2012 May;27(3):615-20. doi: 10.1007/s10103-011-0998-7.

Scwingel AR, Barcessat AR, Núñez SC, Ribeiro MS. Antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of oral candidiasis in HIV-infected patients. Photomed Laser Surg. 2012 Aug;30(8):429-32.

Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. Oral Dis. 2008 Oct;14(7):582-90.

Sharma S, Hegde V. Comparative Evaluation of antifungal activity of melaleuca oil and fluconazole when incorporated in tissue conditioner: An *in vitro* study. J Prosthodont. 2014 Jul;23(5):367-73. doi: 10.1111/jopr.12117.

Silk H. Diseases of the Mouth. Prim Care. 2014 Mar;41(1):75-90. doi: 10.1016/j.pop.2013.10.011.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. Trends Microbiol. 2011 Mar 14;19(5):241-7.

Skupien JA, Valentini F, Boscato N, Pereira-Cenci T. Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: A systematic review. J Prosthet Dent. 2013 Nov;110(5):356-62.

Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? Adv Drug Deliv Rev. 2005 Jul 29;57(10):1539-50.

Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AOC. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. Lasers Med Sci. 2010 May;25(3):385-9. doi: 10.1007/s10103-009-0706-z.

Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AO. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. J Photochem Photobiol B. 2006 Apr 3;83(1):34-8.

Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. J Clin Microbiol. 1998;36(2):329-34.

Takahashi N, Iwasa F, Inoue Y, Morisaki H, Ishihara K, Baba K. Evaluation of the durability and antiadhesive action of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine grafting on an acrylic resin denture base material. J Prosthet Dent. 2014 Aug;112(2):194-203.

Tardivo JP, Del Giglio A, Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2005 Sep;2(3):175-91. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.

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 Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002 Feb;93(2):155-60.

Ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. J Dent Res. 2009 Feb;88(2):105-15.

Thomas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. J Am Dent Assoc. 2006 Nov;137Suppl:10S-15S.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed;2008. 894 p.

Tsang PW, Wong AP, Yang HP, Li NF. Purpurin triggers caspase-independent apoptosis in *Candida dubliniensis* biofilms. Plos One. 2013 Dec;8(12):e86032. doi:10.1371/journal.pone.0086032.

Vilela SF, Junqueira JC, Barbosa JO, Majewski M, Munin E, Jorge AOC. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: an *in vitro* study. Arch Oral Biol. 2012 Jun;57(6):704-10.

Wainwright M, Crossley KB. Photosensitizing agents circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. Int Biodeter Biodegr. 2004;53(2):119-26.

Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA. Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol* 2000. 2011 Feb;55(1):250-65.

Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med*. 1993 Sep;22(8):354-7.

Wilson M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May;3(5):412-8.

Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev*. 2000;24(5):661-71.

Wong SS, Kao RY, Yuen KY, Wang Y, Yang D, Samaranayake LP, et al. *In vitro* and *in vivo* activity of a novel antifungal small molecule against *Candida* infections. *Plos One*. 2014 Jan 22;9(1):e85836. doi:10.1371/journal.pone.0085836.

Yan L, Yang C, Tang J. Disruption of the intestinal mucosal barrier in *Candida albicans* infections. *Microbiol Res*. 2013;168(7):389–95.