

## AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO AO ÓLEO SAFETEAM® SOBRE CEPAS DE CANDIDA ALBICANS ISOLADAS DE CATETER

## EVALUATION OF THE ASSOCIATION OF THE PHOTODYNAMIC THERAPY WITH METHYLENE BLUE TO SAFETEAM® OIL ON CANDIDA ALBICANS STRAINS ISOLATED FROM CATHETER

Mirian Freitas<sup>1</sup>

Amanda Machado<sup>2</sup>

Anelise Doria<sup>3</sup>

Raduan Hage<sup>4</sup>

Sônia Khouri<sup>5</sup>

**Resumo:** As espécies de *Candida* estão entre as principais causas de infecção da corrente sanguínea, promovendo elevados índices de mortalidade, sendo a *Candida albicans* a espécie mais frequente em infecções hospitalares. Atualmente, diversos medicamentos antifúngicos são utilizados, porém podem ser tóxicos ao hospedeiro e, com o seu uso excessivo, as leveduras têm adquirido resistência ao tratamento convencional. O objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos da associação da Terapia Fotodinâmica (PDT) com Azul de Metileno ao óleo Safeteam® e o seu efeito na inativação sobre cepas de *Candida albicans* isoladas de cateter. O experimento foi realizado com a irradiação dos grupos, em placa de Kline, utilizando LED (Diodo Emissor de Luz) e densidade de energia de 15 J/cm<sup>2</sup>, sendo, posteriormente, incubadas a 37°C por 48h, e realizada análise quantitativa para avaliar o percentual de redução de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). Quando analisado o efeito da associação do óleo Safeteam® à PDT, foi observada uma significativa redução de UFCs, quando comparado ao grupo controle e o grupo utilizando o óleo e a PDT isoladamente, demonstrando ser uma promissora modalidade terapêutica na inativação, *in vitro*, de cepas de *Candida albicans* isoladas de cateter.

**Palavras-chave:** *Candida albicans*; óleo essencial; terapia fotodinâmica.

**Abstract:** *Candida* species are among the leading causes of bloodstream infection, promoting high mortality rates, with *Candida albicans* as the most common species in hospital infections. Currently, many antifungal medicines are used, but they can be toxic to the host and with their excessive use, yeasts have acquired resistance to the conventional treatment. The aim of this study is to evaluate the effects of the association of the Photodynamic Therapy (PDT) with Methylene Blue to Safeteam® oil and its effect on the inactivation of *Candida albicans* strains isolated from a catheter. The experiment was conducted with the irradiation of the groups, in Kline card, using LED (Light Emitting Diode) and an energy density of 15 J / cm<sup>2</sup>, following incubation at 37 °C for 48 h, as well as quantitative analysis to evaluate the percentage of reduction of Colony Forming Units (CFU). When the effect of the Safeteam® oil association to PDT was observed, a significant reduction in CFUs was observed when compared to the control group and the group using oil and

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, SP, Brasil. E-mail: mirianafreitas@hotmail.com.

<sup>2</sup> Laboratório de Microbiologia da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, SP, Brasil. E-mail: amanda.lopes9410@yahoo.com.br.

<sup>3</sup> Laboratório de Microbiologia da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, SP, Brasil. E-mail: ane.doria@gmail.com.

<sup>4</sup> Doutor em Cirurgia e Experimentação. Laboratório de Microbiologia e docente na Universidade do Vale do Paraíba - Univap, SP, Brasil. E-mail: raduan@univap.br.

<sup>5</sup> Doutora em Microbiologia. Laboratório de Microbiologia e docente na Universidade do Vale do Paraíba - Univap, SP, Brasil. E-mail: soniak@univap.br.

*PDT alone, proving to be a promising therapeutic modality in the in vitro inactivation of Candida albicans strains isolated from the catheter.*

**Keywords:** *Candida albicans*; essential oil; photodynamic therapy.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso do cateter venoso central em ambiente hospitalar é amplamente aceito em todas as áreas da medicina clínica. É utilizado em diversas funções hemodinâmicas, bem como diagnósticos, terapia intravenosa, monitoramento da pressão sanguínea, especialmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Em diversas situações clínicas, os benefícios do uso do cateter são significantes, porém está relacionado a uma constante causa de infecção hospitalar associada à mortalidade e morbidade de pacientes, devido à elevada permanência em ambiente hospitalar (STORTI et al., 2007).

A incidência de infecções hospitalares por fungos tem aumentado, gradativamente, nas últimas décadas, promovendo elevados índices de mortalidade. As espécies de *Candida* estão entre a terceira e a quarta principal causa de infecção da corrente sanguínea (TAMURA et al., 2007; KHOURI, 2010) e estão presentes na microbiota normal da pele, boca, trato digestivo e vagina. Devido à sua natureza oportunista e quando associada a fatores de predisposição, possuem a capacidade de invadir tecidos e se aderirem a materiais artificiais, tais como sondas, cateteres de látex, entre outros materiais. A *Candida albicans* é a espécie mais frequente em infecções hospitalares, porém as espécies de *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* têm adquirido importância clínica crescente (RÖRIG; COLACITE; ABEGG, 2009; CAMPOS; MENEZES; PONE, 2004; BARBIERI et al., 2007).

O potencial de virulência ou patogenicidade da levedura consiste na sua capacidade em aderir, infectar e causar doença. Um dos principais mecanismos de virulência é a sua versatilidade de adaptação e capacidade de adesão em diversos locais, ocasionando a formação de comunidades microbianas, denominadas biofilmes (SANTANA, 2011).

Atualmente, diversos medicamentos antifúngicos são utilizados, porém possuem limitações, por serem tóxicos ao hospedeiro. O tratamento convencional é feito por meio da administração de Anfotericina B e Fluconazol. A Anfotericina B é um antifúngico com amplo espectro de ação que inibe a síntese do ergosterol, um componente da parede fúngica. Mesmo com a sua alta toxicidade, a Anfotericina B ainda permanece como fármaco de escolha no tratamento. O Fluconazol é um antifúngico mais seguro e com boa atividade clínica contra *Cryptococcus neoformans* e a maioria de *Candida spp.* As espécies não-*albicans* podem apresentar maior resistência ao Fluconazol, sendo necessário utilizar Anfotericina B (MODESTO et al., 2014; SANTOS et al., 2009). Devido ao uso excessivo, têm favorecido a resistência dessas leveduras aos agentes antifúngicos convencionais e o estudo de métodos alternativos de controle desses

microrganismos vem sendo necessários, visando à redução do tempo de tratamento e os efeitos colaterais (KHOURI, 2010; COSTA et al., 2010).

O uso de produtos naturais está sendo amplamente estudado pelas suas características terapêuticas, podendo ser uma alternativa promissora no tratamento de diversas doenças (FERREIRA et al., 2014; LIMA et al., 2006). Os óleos essenciais extraídos das frutas cítricas são utilizados em diversas áreas devido ao seu amplo espectro de ação, entre elas a ação antimicrobiana. O extrato de semente de Pomelo (Safeteam®) é considerado um agente antimicrobiano natural derivado das sementes e da polpa do fruto (CAETANO; MADALENO, 2011; HUNG et al., 2013).

A terapia fotodinâmica (TFD) vem sendo amplamente utilizada como tratamento antimicrobiano. Consiste na utilização de um composto químico (Fotossensibilizador) que submetido à irradiação com luz visível e na presença de oxigênio, produz danos celulares que inativam os microrganismos (CARMELLO, 2011). A interação de luz, comprimento de onda adequado, fotossensibilizador e oxigênio, resultam em espécies reativas capazes de induzir a inviabilização de células (MACHADO, 1999). Na presença de oxigênio encontrado nas células, o fotossensibilizador pode reagir com as moléculas por transferência de elétrons ou hidrogênio, gerando radicais livres (reação do tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), gerando o oxigênio singleto. O oxigênio encontra-se no estado tripleto nas células, quando há interação com o fotossensibilizador, o mesmo passa para um estado mais elevado de excitação, ocasionando a destruição celular devido à oxidação dos constituintes celulares (PERUSSI, 2007; MODESTO et al., 2014).

Com a crescente variedade de micro-organismos patogênicos resistentes aos antifúngicos, o presente estudo tem como objetivo avaliar a associação do óleo Safeteam® à PDT utilizando o azul de metileno e o seu efeito na inativação sobre cepa de *Candida albicans* isoladas de cateter.

## 2. METODOLOGIA

Este trabalho teve seus ensaios realizados no Laboratório de Microbiologia, situado no NUFABI (Núcleo de Estudos Farmacêuticos e Biomédicos) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Campus Urbanova.

As amostras analisadas foram utilizadas no trabalho de conclusão de curso em Biomedicina – UNIVAP intitulado como “Estudo comparativo entre hemoculturas e culturas de cateter para leveduras do gênero *Candida* de origem hospitalar”, com aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté, em 23 de Fevereiro de 2012, sob o protocolo CEP/UNITAU n.º 542/11, posteriormente foram armazenadas em refrigerador a -80° C.

Para os ensaios, foram utilizadas cepas clínicas de *Candida albicans* isoladas de cateter com referência P2CV e P14CV e cepa ATCC 10231. A padronização do tempo mínimo de exposição ao LED foi realizada testando os tempos de 3, 6 e 9 minutos com densidade de energia de 15 J/cm<sup>2</sup>, 30 J/cm<sup>2</sup> e 45 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Utilizou-se como fonte de Luz um Diodo Emissor de Luz (LED) de cor vermelha (LED - VET-M.Optics®), com comprimento de onda de 660 nm, potência de 150 mW. Para os ensaios posteriores, foi utilizado o menor tempo de exposição ao LED em que houvesse redução de UFCs, sendo esse o tempo de três minutos (15J/cm<sup>2</sup>). Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foram testadas as concentrações de 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1,0%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,06%, 0,03%, 0,01%, 0,008%, 0,004% e 0,002%, diluídas em água ultrapura estéril, realizando a técnica de difusão em ágar. A concentração utilizada corresponde a uma concentração abaixo da CIM do óleo, a qual não houvesse halo de inibição (0,03%).

Inicialmente, as leveduras foram cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 37°C por 48h, em estufa microbiológica. Posteriormente, foram diluídas em solução salina 0,9% estéril de acordo com a escala 0,5 de MacFarland.

Para cada cepa analisada (P2CV, P14CV e ATCC 10231), o experimento foi dividido em quatro grupos, sendo eles: I- *Candida albicans* II- *Candida albicans* e óleo Safeteam® 0,03%; III- *Candida albicans* e PDT; e IV- *Candida albicans*; óleo Safeteam® 0,03 e PDT. Os grupos I e II não receberam tratamento pelo LED e os grupos III e IV receberam tratamento pelo LED, por três minutos de exposição à irradiação. Nos ensaios, o fotossensibilizador Azul de Metileno (0,05 mg/dl) foi adicionado ao óleo Safeteam® (0,03%), juntamente às cepas de *Candida albicans*. Posteriormente, foram incubadas, durante cinco minutos, no escuro e irradiadas em placa de Kline, utilizando-se o LED durante três minutos. As amostras foram semeadas por espalhamento em placas de ágar Sabouraud e incubadas a 37C por 48h. Após o período de incubação, foram realizadas as análises quantitativas por meio da determinação de UFCs, em cada grupo testado, antes e após o tratamento. Para melhor análise e contagem de UFCs, os grupos foram diluídos 1/100, tendo seu valor corrigido ao final das análises.

### 3. RESULTADOS

Após os ensaios para avaliação antifúngica da associação do óleo à PDT, foi observado, na cepa clínica P14CV, que o óleo a 0,03% reduziu 87% o crescimento de *Candida albicans* e, analisando apenas o efeito da PDT com o Azul de Metileno, houve redução de 80% de UFCs, quando irradiado por três minutos. Quando analisado o efeito da associação do óleo Safeteam® à PDT, observou-se redução de quase 100% de UFCs, conforme demonstrado na tabela 1.

**Tabela 1- Análise quantitativa dos diferentes grupos antes e após o tratamento com PDT e o óleo Safeteam® sobre cepa P14CV.**

Grupo	UFC/ml	% Redução
I	$1,172 \times 10^5$	0
II	$1,5 \times 10^4$	87
III	$2,37 \times 10^4$	80
IV	$1,0 \times 10^2$	99,9

I- *C. albicans*; II- *C. albicans* e Safeteam® 0,03%; III- *C. albicans* e PDT; IV- *C. albicans*, Safeteam® 0,03% e PDT;

**Fonte: Autores.**

Na cepa clínica P2CV, foi observou-se a redução de 78% de UFCs quando utilizado o óleo na concentração de 0,03% e na presença somente do Azul de Metileno e irradiação por três minutos, observou-se, também redução de 73% de UFCs de *Candida albicans*. Analisando a associação de ambas modalidades terapêuticas, pode-se observar redução de 100% de UFCs, conforme apresentado na tabela 2.

**Tabela 2- Análise quantitativa dos diferentes grupos antes e após o tratamento com PDT e o óleo Safeteam® sobre cepa P2CV.**

Grupo	UFC/ml	% Redução
I	$1,156 \times 10^5$	0
II	$2,48 \times 10^4$	78
III	$3,04 \times 10^4$	73
IV	0	100

*C. albicans*; II- *C. albicans* e Safeteam® 0,03%; III- *C. albicans* e PDT; IV- *C. albicans*, Safeteam® 0,03% e PDT.

**Fonte: Autores.**

Quando avaliada a ação antifúngica da associação do óleo à PDT frente à cepa ATCC 10231 de *Candida albicans*, foi observado que o óleo a 0,03% reduziu 81% o crescimento de *Candida albicans*. Analisando apenas o efeito da PDT com o azul de metileno, também houve redução de 81% de UFCs, quando irradiado por três minutos. Quando analisado o efeito da associação do óleo Safeteam® à PDT, observou-se redução de 100% de UFCs, conforme demonstrado na tabela 3.

**Tabela 3- Análise quantitativa dos diferentes grupos antes e após o tratamento com PDT e o óleo Safeteam® sobre cepa ATCC 10231**

Grupo	UFC/ml	% Redução
I	$5,28 \times 10^5$	0
II	$1,0 \times 10^5$	81
III	$1,0 \times 10^5$	81
IV	0	100

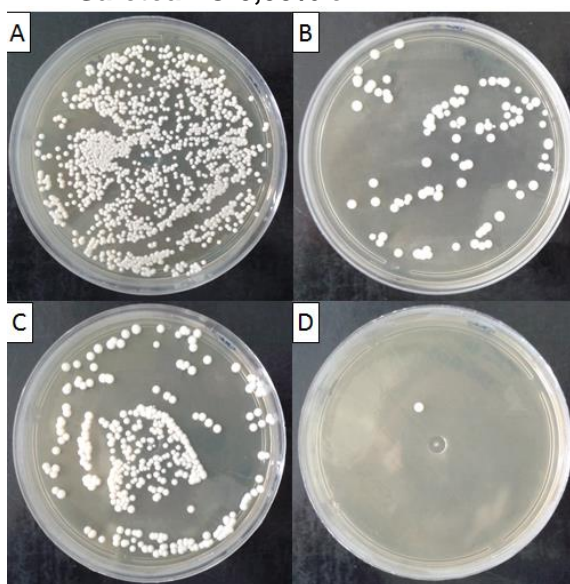
I- *C. albicans*; II- *C. albicans* e Safeteam® 0,03%; III- *C. albicans* e PDT; IV- *C. albicans*, Safeteam® 0,03% e PDT.

**Fonte: Autores.**

A Figura 1 apresenta o crescimento de *Candida albicans* P14CV em placa de ágar Sabouraud antes e após o tratamento com o LED. Na figura 1<sup>a</sup>, encontra-se o controle de crescimento de *Candida albicans*, e pode-se observar um crescimento homogêneo. Na figura 1B, encontra-se o grupo que corresponde ao uso do óleo a 0,03% e podemos observar um crescimento de  $1,5 \times 10^4$  UFC/ml. Na figura 1C encontra-se o grupo, que corresponde à PDT, e pode-se observar o crescimento de  $2,37 \times 10^4$  UFC/ml. Na figura 1D, encontra-se o grupo que corresponde à associação do óleo à PDT, resultando na redução de 100% de UFCs.

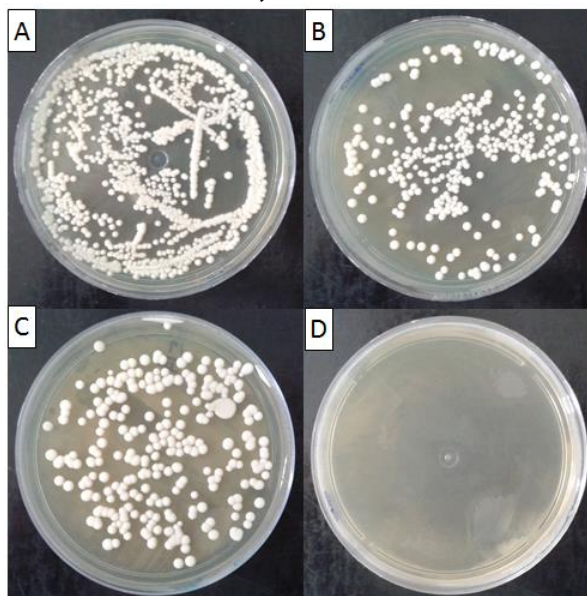
Na Figura 2, é demonstrado o crescimento de *Candida albicans* P2CV antes e após o tratamento com o LED. Na Figura 2A, encontra-se o grupo controle de crescimento de *Candida albicans*; na Figura 2B, o grupo com o tratamento com o óleo a 0,03%, no qual, podemos observar o crescimento de  $2,48 \times 10^4$  de UFCs. Na Figura 2C, pode-se observar um crescimento de  $3,04 \times 10^4$  de UFCs quando utilizado somente o LED com o Azul de Metileno. Na figura 2D, encontra-se o grupo correspondente ao uso do óleo e PDT, resultando na redução de 100% de UFCs.

**Figura 1- Crescimento de *C. albicans* P14CV antes e após o tratamento com o LED e óleo Safeteam®. A- Grupo I: *C. albicans*; B- Grupo II: *C. albicans* e Safeteam® 0,03%; C- Grupo III: *C. albicans* e PDT; D- Grupo IV: *C. albicans*, Safeteam® 0,03% e PDT.**



Fonte: Autores.

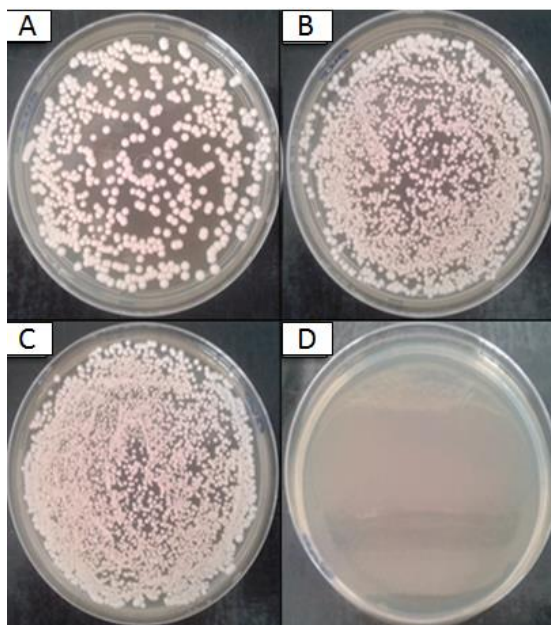
**Figura 2- Crescimento de *C. albicans* P2CV antes e após o tratamento com o LED e óleo Safeteam®. A- Grupo I: *C. albicans*; B- Grupo II: *C. albicans* e Safeteam® 0,03%; C- Grupo III: *C. albicans* e PDT; D- Grupo IV: *C. albicans*, Safeteam® 0,03% e PDT.**



**Fonte: Autores.**

A Figura 3 apresenta o crescimento de *Candida albicans* ATCC 10231 antes e após o tratamento com o LED. Na Figura 3A, encontra-se o controle de crescimento de *Candida albicans*, diluída a 1/100, e pode-se observar seu crescimento homogêneo. Na figura 2B, encontra-se o grupo II, que corresponde ao uso do óleo a 0,03% e pode-se observar, também, um crescimento homogêneo de colônias. Na figura 3C, encontra-se o grupo correspondente à PDT, no qual pode-se observar o crescimento homogêneo de colônias superior a 100.00UFC/ml. Na figura 3D, encontra-se o grupo que corresponde à associação do óleo à PDT, resultando na redução de 100% de UFCs.

**Figura 3- Crescimento de *C. albicans* ATCC 10231 antes e após o tratamento com o LED e óleo Safeteam®. A- Grupo I: *C. albicans* diluída 1/100; B- Grupo II: *C. albicans* e Safeteam® 0,03%; C- Grupo III: *C. albicans* e PDT; D- Grupo IV: *Candida albicans*, óleo Safeteam® 0,03% e PDT.**



**Fonte: Autores.**

#### **4. DISCUSSÃO**

As espécies do gênero *Candida*, principalmente *Candida albicans*, estão associadas a quase 80% de todas as infecções fúngicas nosocomiais, representando a maior causa de fungemia (HINRICHSEN et al., 2007). O trabalho de Tamura et., al (2007) avaliou o potencial de virulência de leveduras isoladas de cateteres venosos e mãos de trabalhadores de um hospital, constatando que as leveduras isoladas das mãos apresentaram menor potencial de virulência do que as isoladas nos cateteres.

Diversos estudos promissores têm sido utilizados, baseando-se na fotossensibilização de corantes por radiação laser de baixa potência. No trabalho de Peli (2007), foi avaliado o efeito da terapia fotodinâmica sobre culturas de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, utilizando LED (630nm) e o fotossensibilizador azul de metileno com irradiação de trinta minutos. Os autores não observaram redução do crescimento dos microrganismos expostos à luz LED sozinha. No entanto, na presença de azul de metileno, inibiu-se o crescimento dos três micro-organismos testados, comprovando a eficiência da terapia fotodinâmica no controle de bactérias e fungos. Oliveira et al. (2015) observou redução de 74,90% de células de *Candida albicans* ATCC quando utilizado laser de baixa potência a um tempo de irradiação de 3 minutos. No presente estudo, foram testadas cepas clínicas isoladas de cateter e quando avaliada a PDT no tempo de irradiação por três minutos, utilizando LED, observaram-se 80% e 73% de redução



de UFCs na cepa P14CV e P2CV, respectivamente, sendo o menor tempo de exposição em que houve inativação do crescimento de *Candida albicans*.

Considerando a ampla atividade biológica apresentada pelos produtos de origem natural, os óleos essenciais obtidos a partir das espécies vegetais de *Citrus* têm sido investigados para a determinação de suas atividades antimicrobianas (CASTRO; LIMA, 2011).

A atividade antifúngica do óleo Safeteam® (extraído do fruto de Pomelo) sobre cepas de *Candida albicans* foi eficiente na concentração analisada, sendo possível observar redução de 87% na cepa P14CV e 78% na cepa P2CV. Castro e Lima (2011) testaram a susceptibilidade de espécies de *C. albicans* e *C. tropicalis* frente aos óleos essenciais de *Citrus reticulata*, *Citrus aurantifolia*, *Cinnamomun zeylanicum*, *Matricaria chamomilla*, *Mentha piperita*, *Eugenia uniflora* e *Zingiber officinale*. Todos os óleos essenciais avaliados apresentaram efetividade na inibição do crescimento das cepas testadas, representando uma possível aplicação na prevenção e tratamento de doenças infecciosas de origem fúngica.

Hung e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antifúngica dos óleos essenciais extraídos das cascas de *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus grandis* Osbeck (pomelo) e *Citrus aurantifolia* Swingle. Após o cultivo, o crescimento do fungo *Mucor hiemalis* foi reduzido em 100% com o aumento da concentração de *Citrus aurantifolia* Swingle. Os óleos *Citrus grandis* Osbeck e *Citrus aurantifolia* Swingle foram mais eficazes na redução do crescimento do micélio de *Penicillium expansum*, apresentando redução de 54 e 52%, respectivamente. O crescimento do *Fusarium proliferatum* foi reduzido (91,5%) frente o uso de *Citrus aurantifolia* Swingle.

No presente ensaio, quando avaliada a associação do óleo à PDT, obtiveram-se 99,9% de redução na cepa P14CV e 100% de redução de UFCs na cepa P2CV, conforme apresentado na tabela 1 e 2. No trabalho de Freitas et al., (2015), foi avaliada a curva de absorvância do óleo, na qual não houve absorção de luz no comprimento de onda de 660nm, correspondente ao comprimento de onda do LED utilizado nesse experimento. Entretanto, nos ensaios realizados, observou-se que as duas modalidades terapêuticas, quando utilizadas em conjunto, proporcionaram um efeito sinérgico na inativação, *in vitro*, de cepas de *Candida albicans* isoladas de cateter. No presente estudo, quando avaliada a ação, somente, do óleo pôde-se observar redução de 87% na cepa P14CV, 78% na cepa P2CV e 81% na cepa ATCC 10231, demonstrando ação terapêutica diferente entre as cepas isoladas de material clínico e ATCC, porém eficiente em todas elas. Utilizando apenas PDT com Azul de metileno, pôde-se observar uma redução de 80%, 73% e 81% nas cepas P14CV, P2CV e ATCC 10231, respectivamente, e, quando avaliado o efeito da associação das duas modalidades terapêuticas e o seu efeito sobre as três cepas de *Candida albicans* analisadas, pôde-se observar uma redução de 100% em todas elas, sendo uma promissora alternativa de tratamento.

## 5. CONCLUSÃO

O óleo Safeteam® e a TFD empregadas isoladamente, nas concentrações e dosimetria utilizadas nesse estudo, se mostraram eficientes na inativação *in vitro* de cepas de *Candida albicans* isoladas de cateter (P14CV e P2CV).

A associação do óleo Safeteam® à TFD com o azul de metileno mostrou um efeito sinérgico importante promovendo a inativação completa (100%), *in vitro*, de cepas de *Candida albicans* (P14CV e P2CV) isoladas de cateter demonstrando assim ser uma promissora alternativa de tratamento, não invasivo, para as infecções ocasionadas por *Candida albicans*.

## Referências

- BARBIERI, D. S.V. et al. Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, n. 4, 2007.
- CAETANO, A. C. G; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência e Tecnologia: Fatec-JB, Jaboticabal**, v.2, n.1, p. 27-37, 2011.
- CAMPOS, J. M.S; MENEZES, L. F. de; PONE, M. V. da S. **Infecções fúngicas no período neonatal**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2004.
- CARMELLO, J.C. **Efetividade da Terapia Fotodinâmica mediada pelo fotossensibilizador Photodithazine® na inativação de *Candida albicans* in vivo**. 2011. 141f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Universidade estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- CASTRO, R. D; LIMA, E.O. Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de *Candida*. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, v. 11, n. 3, p. 341-345, 2011.
- COSTA, A. C. B. P. da. et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre leveduras isoladas de candidíase bucal de gestantes HIV positivas. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p 403-407, 2010.
- FERREIRA, J.A.S. et al. Atividade do Óleo essencial de pequi sobre formas promastigotas de *Leishmania chagasi*. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 18; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 14 e ENCONTRO DE INICIAÇÃO À DOCÊNCIA, 4, São José dos Campos, 2014. **Anais...**, São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2014.
- FREITAS, M. A. A. et al. Avaliação dos efeitos do Óleo Safeteam® associado à Terapia Fotodinâmica com Azul de Metileno em cepa ATCC de *Candida albicans*. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19, ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 15 e ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA JUNIOR, 9. São José dos Campos, 2015. **Anais...**, São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2015.

HINRICHSEN, S.L. et al. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 394-398, 2008.

HUNG, P.V. et al. Comparison of antifungal activities of Vietnamese citrus essential oils. **Natural Product Research**. v. 27, n. 4-5, p. 506-508, 2013.

KHOURI, S. **Leveduras isoladas de pacientes internados em hospital universitário da cidade de Taubaté- SP**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LIMA, I.O. et al. Antifungal activity from essential oils on *Candida* species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n. 2, p. 197-201, 2006.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v.23, n.2, 2000.

MODESTO, M.C. et al. Padronização da metodologia utilizando terapia fotodinâmica sobre cepa de *Candida albicans* isolada de cateter. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 18; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS- GRADUAÇÃO, 14 e ENCONTRO DE INICIAÇÃO À DOCÊNCIA, 4. São José dos Campos, 2014. **Anais...**, São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2014.

OLIVEIRA, B. P. et al. *In vitro* antimicrobial photoinactivation with methylene blue in different microorganisms. **Braz. J. Oral Sci.**, v. 13, n.1, 2014.

PELOI, L. S. **Estudos da aplicação do corante azul de metileno em Terapia Fotodinâmica**. 2007. 67f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

PERUSSI, J. R. Photodynamic Inactivation of Microorganisms. **Quím. Nova**, v. 30, n. 4, 2007.

RÖRIG, K.C.O; COLACITE, J.; ABEGG, M.A. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 2, 2009.

SANTANA, D. P. Formação de biofilme de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA,9; JORNADA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA, 6, Anápolis. **Anais...**, Anápolis: Universidade Estadual de Goiás, 2011.

SANTOS, L. S. et al. Perfil de sensibilidade de amostras isoladas de casos de candidurias hospitalares aos antifúngicos convencionais. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13 e ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 9. São José dos Campos, 2009. **Anais...**, São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

STORTI, A. et al. Biofilme detectado em ponta de cateter venoso central por cultura usando método quantitativo. **RBAC**, v. 39, n. 3, p. 183-187, 2007.

TAMURA, N. K. et al. Fatores de virulência de *Candida spp* isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.