

## Efecto fotosensibilizador *in vitro* de la violeta de genciana en la terapia fotodinámica sobre *Candida albicans*

## Efeito fotossensibilizador *in vitro* da violeta de genciana na terapia fotodinâmica sobre *Candida albicans*

## Photosensitizing effects of *In vitro* crystal violet on photodynamic therapy for *Candida albicans*

Recibido: 05/08/2017  
 Aprobado: 18/11/2017  
 Publicado: 05/04/2018

Rachel Christina de Queiroz Pinheiro <sup>1</sup>  
 Matheus Sousa Peixoto <sup>2</sup>  
 Isabella Lima Arrais Ribeiro <sup>3</sup>  
 Daliana Queiroga de Castro Gomes <sup>4</sup>  
 Maria do Socorro Vieira Pereira <sup>5</sup>  
 Cacio de Moura Netto <sup>6</sup>

Este estudio tiene como objetivo evaluar la acción del colorante violeta de genciana, *in vitro*, sobre *Candida albicans*, aislado o como fotosensibilizante, en comparación al azul de metileno en la Terapia Fotodinámica. Fue una investigación experimental con abordaje cuantitativo. El linaje de *Candida albicans* ATCC 1106 fue inoculado obteniéndose un *overnight* de  $1,37 \times 10^4$  UFC/ml. Fueron agregados 50  $\mu$ l de la suspensión fúngica (*overnight*) en 18,0ml de caldo Saboraud. A este conjunto fue agregado el 0,2ml del colorante de la violeta genciana a 1%, fue plaqueado, se esperó el tiempo de pre-irradiación de 5 minutos y se aplicó el láser rojo. La dosis aplicada fue de 100J/cm<sup>2</sup>, con energía total de 3J, después fueron subcultivadas a 37°C en caldo Saboraud por 1 hora. Después de este período, una alícuota de 1,0ml fue diluida en 9,0ml de solución salina 0,85% esterilizada. 0,1ml de esta dilución fue plaqueada y plantada en agar saboraud. Las placas, en triplicata, fueron incubadas en estufa para microorganismos a 37°C, y después de 48h fue hecho el conteo de las UFCs/ml. Además de la violeta genciana a 1% combinada a láser, fueron analizados los grupos: azul de metileno a 1% asociado al láser, azul de metileno a 1%, violeta genciana a 1%, y el láser sin adición de colorantes. Los análisis fueron realizados en el software IBM SPSS (21.0), se utilizó el test de Kruskal-Wallis (Mann-Whitney) y el test de Friedman (Wilcoxon), adoptándose un nivel de significancia de  $\alpha=5\%$ . Como resultado se observó que la violeta genciana a 1% asociada al láser tiene efecto importante contra *Candida albicans* en la terapia fotodinámica.

**Descriptores:** Fotoquimioterapia; *Candida albicans*; Terapia a láser; Violeta de genciana; Azul de metileno.

Este estudo tem como objetivo avaliar a ação do corante violeta de genciana, *in vitro*, sobre *Candida albicans*, isolado ou como fotossensibilizante, em comparação ao azul de metileno na Terapia Fotodinâmica. Foi uma pesquisa experimental com abordagem quantitativa. A linhagem de *Candida albicans* ATCC 1106 foi inoculada obtendo-se um *overnight* de  $1,37 \times 10^4$  UFC/ml. Foram adicionados 50  $\mu$ l da suspensão fúngica (*overnight*) em 18,0ml de caldo Saboraud. A esse conjunto foi adicionado o 0,2ml do corante da violeta genciana a 1%, foi plaqueado, esperou-se o tempo de pré-irradiação de 5 minutos e aplicou-se o laser vermelho. A dose aplicada foi de 100J/cm<sup>2</sup>, com energia total de 3J, depois foram subcultivadas a 37°C em caldo Saboraud por 1 hora. Após este período, uma alíquota de 1,0 ml foi diluída em 9,0ml de solução salina 0,85% esterilizada. 0,1 ml dessa diluição foi plaqueada e semeada em ágar saboraud. As placas, em triplicata, foram incubadas em estufa para microorganismos a 37°C, e após 48h foi feita a contagem das UFCs/ml. Além da violeta genciana a 1% combinada ao laser, foram analisados os grupos: azul de metileno a 1% associado ao laser, azul de metileno a 1%, violeta genciana a 1%, e o laser sem adição de corantes. As análises foram realizadas no software IBM SPSS (21.0), utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (Mann-Whitney) e o teste de Friedman (Wilcoxon), adotando-se um nível de significância de  $\alpha=5\%$ . Como resultado observou-se que a violeta genciana a 1% associada ao laser tem efeito importante contra *Candida albicans* na terapia fotodinâmica.

**Descriptores:** Fotoquimioterapia; *Candida albicans*; Terapia a laser; Violeta de genciana; Azul de metileno.

This study aimed at evaluating the action of the *in vitro* dye crystal violet on *Candida albicans*, isolated or as a photosensitizing tool, when compared to methylene blue in photodynamic therapy. It was an experimental and quantitative research. The ATCC 1106 *Candida albicans* strain was inoculated with an overnight  $10^4$  UFC/ml. 50  $\mu$ l of the fungal suspension (*overnight*) were added to 18,0ml of Saboraud agar. To this, 0,2ml of the crystal violet dye was added at 1% and plated. A five-minute period of pre-irradiation was conceded to the sample, after which the red laser was applied. The dosage applied was that of 100J/cm<sup>2</sup>, with a total energy of 3J. After that, the samples were subcultured in Saboraud agar at 37°C, for 1 hour. After this period, an aliquot of 1.0 ml was diluted in 9.0 ml of 0.85% sterilized saline solution. 0.1 ml of the diluted result was plated and cultured in saboraud agar. Three plates were incubated in a growth chamber for micro-organisms at 37°C, and after 48h, the UFCs/ml were counted. In addition to the 1% crystal violet with the laser, the following groups were analyzed: 1% methylene blue with laser, 1% methylene blue, 1% crystal violet, and the use of the laser with no dye. The analyses were conducted in the IBM SPSS (21.0) software. The Kruskal-Wallis (Mann-Whitney U test) was used as well as the Friedman (Wilcoxon) test, with a significance level  $\alpha=5\%$ . As a result, the 1% crystal violet in conjunction with the laser has an important effect against *Candida albicans* in the photodynamic therapy.

**Descriptors:** Photochemotherapy; *Candida albicans*; Laser therapy; Gentian violet; Methylene blue.

<sup>1</sup> Cirujana Dentista. Magister en Odontología. Profesora del Centro Universitario de João Pessoa-PB, Brasil. ORCID: 0000-0002-8044-7544 E-mail: odontogrup@gmail.com

<sup>2</sup> Cirujano Dentista. João Pessoa, PB, Brasil. ORCID: 0000-0002-2560-0331 E-mail: m.peixotoufpb@gmail.com

<sup>3</sup> Cirujana Dentista. Magister en Diagnóstico Bucal. Doctora en Modelos de Decisión y Salud. Pues Doctora en Epidemiología. PB, Brasil. ORCID: 0000-001-6538-6811 E-mail: isabella\_arrais@yahoo.com

<sup>4</sup> Cirujana Dentista. Magister en Diagnóstico Bucal. Doctora en Odontología. Profesora del Programa de Pos Graduación en Odontología de la Universidad Estadual da Paraíba (UEPB), João Pessoa, PB, Brasil. ORCID: 0000-0002-3154-7039 E-mail: dqcgomes@hotmail.com

<sup>5</sup> Farmacéutica Bioquímica. Magister en Genética. Doctora en Ciencias Biológicas. Profesora de la UFPB, João Pessoa, PB, Brasil. ORCID: 0000-0001-5919-375 E-mail: vieirapereira@uol.com.br

<sup>6</sup> Cirujano Dentista. Magister y Doctor en Endodoncia. Profesor de la UNICSUL y UNIP, SP, Brasil. ORCID: 0000-0003-4495-1 E-mail: cnetto@cruzeirosul.edu.br

## INTRODUCCIÓN

La incidencia de infecciones fúngicas superficiales y profundas ha crecido significativamente a lo largo de los últimos 20 años.

Varias razones son propuestas para explicar este aumento, incluyendo el uso de medicamentos antineoplásicos e inmunosupresores, antibióticos de amplio espectro, prótesis, injertos y cirugías más agresivas<sup>1</sup>. Con el desarrollo de la medicina, en el campo de la cirugía y transplantología, el número de individuos inmunocomprometidos y, consecuentemente, más susceptibles a estas infecciones, viene creciendo<sup>2</sup>.

Micosis invasivas representan una amenaza creciente para la salud humana debido a una combinación de diagnósticos lentos y de la existencia de pocas drogas antifúngicas disponibles y eficaces<sup>3</sup>, esta combinación puede desencadenar infecciones sistémicas y/o lugares más graves, extensos y difíciles de ser tratados en la presencia de este hongo<sup>4,5</sup>.

*Candida albicans* (CA), uno de los más frecuentes microorganismos oportunistas de la microbiota oral, se caracteriza como una especie más prevalente responsable por infecciones de las mucosas y piel de pacientes con inmunidad comprometida con especial importancia para la salud humana<sup>6-8</sup>, por provocar micosis superficiales y enfermedad sistémica diseminada<sup>9</sup>.

Como consecuencia de la alta tasa de mortalidad por las infecciones invasivas por *Candida*, de la disponibilidad limitada de agentes antifúngicos eficaces y del aumento de la resistencia a estas drogas disponibles comercialmente, investigaciones son realizadas con el objetivo de obtener alternativas de tratamiento<sup>10,11</sup>. Por eso, estudios están siendo realizados en el área de Terapia Fotodinámica (TFD), que han mostrado efecto bactericida y fungicida en microorganismos orales, a partir de la terapia con láser de baja intensidad (TLBI)<sup>11-13</sup>.

La TFD fue desarrollada para combatir lesiones malignas, no obstante, ha sido utilizada con éxito para el tratamiento de infecciones fúngicas, siendo empleada con

éxito contra la *Candida albicans* y otras especies de *Candida*<sup>7</sup>, reduciendo la posibilidad de la CA causar una infección sistémica<sup>14</sup> y surgiendo como una opción eficaz, la cual desde la investigación de Raab en 1900, que probó la acción del colorante acridina con la luz de relámpagos sobre paramecios, se encuentra bien fundamentada científicamente.

Esta terapia se basa en el concepto de que un colorante no tóxico, conocido como fotosensibilizador (FS), se suele localizar, preferencialmente, en ciertos tejidos o células, y, subsecuentemente, es activado por la luz visible, produciendo especies reactivas de oxígeno (EROS), las cuales pueden matar las células que se ligan al FS<sup>15-17</sup>.

La multiplicidad de blancos en las células (mitocondrias, lisosomas y núcleos) de los hongos reduce el riesgo de cepas resistentes fotomutantes y este riesgo es minimizado por la ausencia de efectos mutagénicos de la TFD<sup>18</sup>, la cual puede ser repetida varias veces, sin inducción aparente de resistencia, ya que el DNI no es el blanco principal de las EROS<sup>19</sup>.

El peligro de daños en el DNA en hongos es reducido por la presencia de una membrana que envuelve el núcleo, actuando como una barrera para la penetración de colorantes o sus fotoproductos de alta energía<sup>20</sup>.

Diferentes tipos de FSs son propuestos en la TFD. La interacción entre el FS, la membrana celular y estructuras intracelulares son de gran relevancia en la respuesta a la TFD. Debido a la gran diversidad de microorganismos, un FS con propiedades físico-químicas distintas puede ser requerido<sup>21</sup>.

La violeta genciana (VG) es una mezcla de colorantes triarilmetanos, usada para teñir el cabello, colorear papel o tejidos, siendo usada en laboratorios de microbiología. Derivada del alquitrán de carbón, ha sido ampliamente utilizada como un producto antiséptico. Su actividad antimicrobiana es reconocida y recomendada para tratamiento de candidiasis<sup>22</sup>. El mecanismo de acción de la VG no está relacionado con una lesión primaria de la membrana citoplasmática

siendo probablemente relacionada con la inhibición de una vía metabólica<sup>23</sup>.

La Organización Mundial de la Salud recomienda la aplicación tópica de VG en una concentración de 1% para el tratamiento inicial de candidiasis oral en pacientes infectados por el VIH en contextos de recursos limitados, dado que el costo del tratamiento es bajo y bien tolerado<sup>24</sup>.

Sin embargo, debido a sus propiedades de coloración de la mucosa bucal, la VG no es usada actualmente para el tratamiento de CA. Un estudio para evaluar la seguridad y eficacia de VG en concentraciones diferentes de VG mostró que ese FS en la concentración de 0,00165% no mancha la cavidad oral, es estable, bien tolerado y posee una potente actividad anti-*Candida*<sup>25</sup>. En otra investigación<sup>23</sup> realizada, se verificó que VG presenta una actividad fungicida para la mayoría de las especies de *Candida*, siendo las *C. albicans* y *C. tropicalis* las especies más susceptibles.

La VG presenta potencial de acción para tratamiento de candidiasis oral debido a su actividad *antibiofilm* y antigerminación. El mecanismo de acción del VG no está asociado a la lesión primaria en la membrana citoplasmática, y probablemente se relaciona a la inhibición del metabolismo celular<sup>23</sup>.

Es posible que la producción de radicales hidroxil/peróxido facilite la penetración de VG a través de la matriz, llevando a la inhibición de la síntesis de la pared celular de los hongos. Los estudios clínicos para determinar la eficacia de la VG en el tratamiento de esta enfermedad son garantizados<sup>26</sup>.

Una dificultad, en la TFD, es la administración de los FSS, los cuales provocan una coloración indeseable en los dientes y en la mucosa bucal<sup>10</sup>. No obstante, estudios *in vivo* demostraron que la cavidad oral es especialmente adecuada para la TFD, pues es relativamente accesible a la aplicación de la luz<sup>27,28</sup>. Además de eso, el FS es de fácil manipulación<sup>7</sup>.

Sabiendo de los resultados positivos de la acción de la VG como antifúngico sobre CA, este trabajo tiene como objetivo evaluar la acción del colorante violeta de genciana, *in*

*vitro*, sobre *Candida albicans*, aislado o como fotosensibilizante en comparación al azul de metileno en la Terapia Fotodinámica.

## MÉTODO

Se realizó un estudio experimental, *in vitro*, en el Laboratorio de Genética de Microorganismos del Departamento de Biología del Centro de Ciencias Exactas y de la Naturaleza de la Universidad Federal da Paraíba (UFPB), en la ciudad de João Pessoa-PB, en el período comprendido entre diciembre de 2014 a enero de 2015.

Fue utilizado el linaje de CA ATCC 1106 (estándar internacional, referencia), perteneciente a la colección de microorganismos del Laboratorio de Micología del Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Centro de Ciencias de la Salud, UFPB.

Este estudio se basó en el método propuesto por Craig; Gudmundson (1991), modificado por Pereira et. al, (2014)<sup>15</sup>. Para la determinación fúngica, el linaje de *Candida albicans* ATCC 1106 fue inoculado en caldo Saboraud e incubado a 37°C por 18-20 horas, obteniéndose un *overnight* de 1,37x10<sup>4</sup> UFC/ml.

Fueron agregados 50µl de la suspensión fúngica (*overnight*) en 18,0ml de caldo Saboraud; a este conjunto fue agregado 0,2 ml del colorante AM a 1% o a VG a 1%. Seguidamente, este conjunto fue llevado al vórtex, y después plaqueado. Se esperó el tiempo de pre-irradiación (TPI) de cinco minutos y se aplicó el láser. La dosis aplicada fue de 100J/cm<sup>2</sup>, con energía total de 3J, potencia de 100mW, en una distancia de 1,0 cm por punto en toda la extensión de la placa de Petri, con la punta a 1,0 cm de altura de la placa. Después fueron subcultivadas a 37°C en caldo Saboraud por 1 hora.

Después de este período, una alícuota de 1ml fue diluida, convenientemente, en 9ml de solución salina 0,85%, esterilizada y llevada al vórtex. Seguidamente, 0,1 ml de este subcultivo fue plaqueado y plantado en agar saboraud.

Las placas fueron incubadas en estufa de crecimiento de microorganismos a 37°C. El conteo de células viables, en este tubo, fue

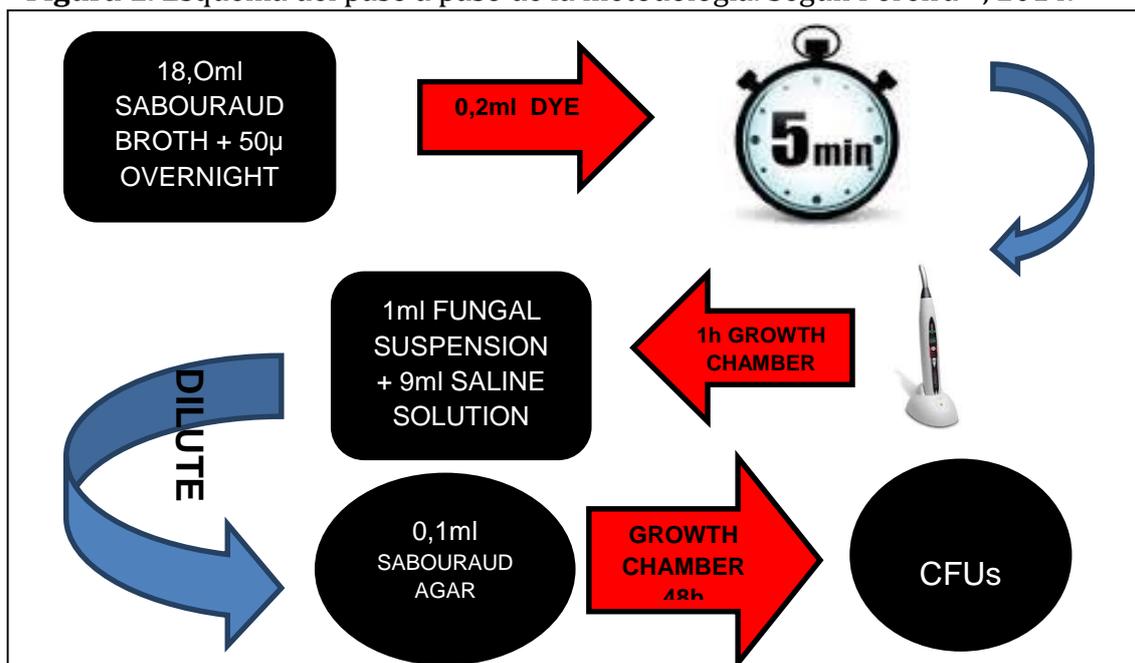
determinado y designado como el tiempo 0 para la determinación del efecto pos-antimicrobiano. El recrecimiento de la cultura fue monitoreado por un período de 24 y 48 horas, por el método estándar de conteo en placas. La lectura de las placas fue efectuada después de la incubación por 48 horas, a 37° C.

Los experimentos fueron realizados en triplicata. Los resultados del conteo de células

viabiles (UFC/ ml) de la cultura tratada fueron descritos en la Tabla 1.

La secuencia fue respetada en la manipulación y determinación del efecto fungicida y en el conteo de las UFCs – con excepción del TPI, que no fue necesario, para los grupos de los colorantes AM a 1% y VG a 1% sin uso del láser, para el grupo control y para el grupo del láser sin FS.

**Figura 1.** Esquema del paso a paso de la metodología. Según Pereira<sup>15</sup>, 2014.



Fue empleado el Láser rojo semiconductor (GaAlAs e InGaAlP), aparato láser DUO MMOPTICS São Carlos, SP, Brasil, con longitud de onda ( $\lambda$ ) de 660 nm, la potencia del aparato fue de 100 mW, la dosis aplicada fue de 100J/cm<sup>2</sup>, con energía total de 3J, en una distancia de 1 cm por punto en toda la extensión de la placa de Petri, con la punta del spot a 1cm de altura de la placa, la emisión del láser fue continua, con el modo de operación puntual.

Estas especificaciones fueron indicadas por el fabricante del aparato en el caso de terapia fotodinámica sin fibra óptica. Las placas de Petri seleccionadas para el uso del FS + láser esperaron el tiempo de pre-irradiación de 5 minutos.

Se realizó el test de normalidad (Shapiro-Wilk) para verificar la distribución

de los datos, donde se observó que, para todos los grupos, la distribución del conteo de UFCs fue no-normal ( $p < 0,05$ ). En la comparación de los promedios de UFCs entre los grupos, en los mismos períodos de tiempo, se realizó el test de Kruskal-Wallis, y en la comparación entre los grupos, dos a dos, se realizó el test de Mann-Whitney.

Ya para la comparación del conteo de UFCs dentro de los grupos, en los diferentes períodos de tiempo, se utilizó el test de Friedman, siendo las diferencias identificadas mediante el test de Wilcoxon. Para todos los análisis se adoptó un nivel de significancia  $\alpha = 5\%$ . Los análisis fueron realizados en el software estadístico IBM SPSS (21.0).

## RESULTADOS

En la referida investigación, cuando se utilizó la VG a 1% asociada al láser, fue realizada la TFD, y se observó que en la 0h hubo una disminución en las UFCs, sin embargo, en las 24h y 48h no hubo formación de colonias, lo que puede ser observado en la Tabla 1.

Al investigarse solo la VG a 1%, fue observado que, en la 0h, hubo una reducción en las UFCs, y en las 24 y 48h no hubo formación de colonias (Tabla 1).

Cuando se investigó el AM a 1% combinado con el láser, es decir, fue efectuada

la TFD, se constató que en la 0h hubo una reducción de las UFCs, y en las 24h y 48h no hubo desarrollo de UFCs (Tabla 1).

En el grupo del AM a 1% aislado fue registrado que a 0h, 24h y 48h hubo un aumento gradual en la formación de las UFCs (Tabla 1).

En el grupo en que solo el láser fue utilizado, hubo una disminución de las UFCs en la 0h, y en las 24h y 48h no hubo producción de estas colonias (Tabla 1).

**Tabla 1.** Valores promedio para las Unidades Formadoras de Colonia (UFCs) obtenidas para el grupo control y para los grupos tratados con Laser, Violeta, Laser + Violeta, Azul de metileno y Laser + Azul de metileno, en los tiempos "0h", "24h" y "48h". João Pessoa, PB. 2015.

Tiempo	Grupo					
	Control	Láser	Violeta	Láser + Violeta	Azul de metileno	Láser + Azul de metileno
0h	3,43 X 10 <sup>3</sup> A a	6,10 x 10 <sup>2</sup> A b	2,04 x 10 <sup>3</sup> A c	1,95 x 10 <sup>3</sup> A c	4,9 x 10 <sup>3</sup> A d	1,73 x 10 <sup>3</sup> A c
24h	1,53 x 10 <sup>6</sup> B a	0 B b	0 B b	0 B b	1,64 x 10 <sup>6</sup> B a	0 B b
48h	2,45 x 10 <sup>8</sup> C a	0 B b	0 B b	0 B b	1,37 x 10 <sup>7</sup> C c	0 B b

Valores expresados en UFC/ml. Letras mayúsculas iguales en columnas y minúsculas iguales en líneas indican no haber diferencias estadísticamente significantes ( $p > 0,05$ ) entre los grupos. Test de Kruskal-Wallis. Test de Friedman.

## DISCUSIÓN

La resistencia de microorganismos a los medicamentos utilizados para tratar infecciones<sup>10,11,18,21</sup> causa serios daños en pacientes inmunocomprometidos y debilitados<sup>3,6,29,30</sup>, pudiendo aumentar las infecciones sanguíneas<sup>31</sup> y elevar la morbilidad y la mortalidad. Estudios en busca de una terapia que proporcione la cura sin causar resistencia viene creciendo en la actualidad, surgiendo, de esta forma, la TFD.

Por reducir la habilidad de la *Candida albicans* causar una infección sistémica<sup>14,24</sup> la TFD ha sido considerada un tratamiento alternativo prometedor para infecciones localizadas<sup>7,11,28</sup>.

Es común usuarios de prótesis presentar candidiasis, una infección oportunista multifactorial, consecuencia de la acción patogénica del hongo CA, siendo considerada la enfermedad de mayor prevalencia en la mucosa oral<sup>3,29,32,33</sup>. A pesar de las

orientaciones en cuanto a la higiene y la recomendación del uso de antifúngicos, se observa una frecuente recurrencia de esta infección<sup>34</sup>.

La VG es un tradicional fungicida agente utilizado para el tratamiento de candidiasis<sup>22,35</sup>, es muy común su uso en niños y ancianos, además de pacientes portadores de virus VIH.

Al asociarse, en esta investigación, la VG a 1% con el láser rojo (660nm), fue constatado que hubo una reducción, en las primeras horas, de colonias formadas, y, en el transcurrir de las horas, no fue verificada la presencia de UFCs. Un estudio<sup>36</sup> en célula de adenosarcoma, *in vitro*, utilizó la VG a 1% asociada al láser Nd:YAG, con resultado satisfactorio. En este mismo trabajo<sup>36</sup>, el investigador también utilizó el AM a 1% con el láser Nd:YAG, con resultados satisfactorios.

En el estudio aquí presentado, al utilizarse la VG a 1%, sin la TFD, fue observado que en la 0h hubo una disminución de las UFCs,

y en las 24h y 48h no hubo formación de colonias.

Una investigación testeó concentraciones menores del FS. La VG a 4µg/ml (0,0004%), redujo la masa de *biofilms* en pacientes con el virus VIH, no obstante, se verificó que cuanto mayor la concentración de la VG, mejores son los resultados obtenidos<sup>26</sup>.

Otro estudio<sup>25</sup> que también testeó en pacientes con VIH la concentración de la VG que hacía diferencia en el tratamiento de la CA, con uso de concentraciones variadas, mostró que la concentración de 0,00165%, la más baja testeada por este, se reveló estable, bien tolerada, no manchó la mucosa oral y posee potente acción contra la CA. A pesar de que estos dos últimos estudios tienen un resultado bueno con concentraciones más bajas de la VG, dado que buscaban tratar pacientes sin ocasionar el malestar de teñir la boca, aún hubo formación de UFCs.

Al ser testeado el colorante AM a 1% con el láser, fue analizado que este, gradualmente, con el tiempo, disminuyó las UFCs, es decir, tiene acción antifúngica. Otra investigación<sup>36</sup> utilizó concentraciones más bajas del colorante AM, y casi todas redujeron las UFCs, pero las concentraciones del AM a 0,045% y 0,05% fueron las únicas que obtuvieron resultados semejantes a este estudio, no habiendo crecimiento de colonias.

Corroborando esta investigación, hay un consenso de que el AM puede ser utilizado con excelentes resultados<sup>6,13,38,39</sup>. Se debe tener precaución al determinarse las concentraciones de los FSs, pues una concentración más alta se hace necesaria para una eficacia mayor de la TFD, no obstante, concentraciones muy altas tienden a no ser absorbidas por los hongos, dificultando la acción de la TFD<sup>3,14</sup>.

Al utilizarse el AM a 1% sin el láser, fue posible observar un aumento del número de CAs. Aunque haya ocurrido reducción, esta no fue significativa, y no es viable el uso del AM sin la TFD<sup>40</sup>.

En el presente estudio, se constató que el láser sin FS es fatal para el microorganismo. Corroborando estos resultados hay otra investigación<sup>12</sup> *in vivo*, que comparó el uso del láser de longitud de onda de 685nm y 830nm,

con el uso de gel oral antifúngico (myconazolom), asociado a una solución antiséptica para la prótesis.

Tal investigación<sup>12</sup> mostró que no hay condiciones de concluir si el efecto fungicida fue alcanzado debido al efecto de la bioestimulación del LBI, o debido a efectos fototérmicos o fotodinámicos relacionados con cromóforos endógenos presentes en los hongos. Yendo al encuentro de estos hallazgos, otro estudio<sup>40</sup> no presentó reducción para la CA y sí para la *Candida tropicalis* al usar sólo el laser sobre estos hongos.

## CONCLUSIÓN

Los resultados *in vitro* indican que la TFD asociada a la VG a 1% puede ser utilizada en el tratamiento de infecciones causadas por la CA, pero existe la necesidad de realizar investigaciones en humanos, dado que puede haber alteración de estos resultados *in vivo*, para comprobar la eficacia de este colorante en la TFD.

## REFERENCIAS

1. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008; 163(1):1-12.
2. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol.* 2009; 56(2):211-24.
3. Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, Denis TGS, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol.* 2012; 3:1-16.
4. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunocompromised patients. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3(11):685-702.
5. Pupo YM, Gomes GM, Santos EB, Chaves L, Michel MD, Koslowski Jr. VA et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as photosensitizing dyes. *Acta Odontol Latinoam.* 2011; 24(2):188-92.
6. Mitra S, Haidaris PHD, Snell SB, Giesselman BR, Hupsher SM, Foster TH. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as

- photosensitizing dyes. *Lasers Surg Med.* 2011; 43(4):324-32.
7. Lyon JP, Moreira LM, de Moraes PC, dos Santos FV, Resende MA. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. *Mycoses.* 2011; 54(5):e265-71.
  8. Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. *Annu Rev. Genomics Hum Genet.* 2012; 13:151-70.
  9. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(1):133-63.
  10. Calzavara-Pinton PG, Rossi MT, Sala R. A retrospective analysis of real-life practice of off-label photodynamic therapy using methyl aminolevulinate (MAL-PDT) in 20 Italian dermatology departments. Part 2: oncologic and infectious indications. *Photochem Photobiol Sci.* [Internet]. 2013 [citado en 12 ene 2017]; 12(1):158-65. DOI: 10.1039/c2pp25125f
  11. Li DD, Xu Y, Zhang D-G, Quan H, Mylonakis E, Hu DD, et al. Fluconazole assists berberine to kill fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(12):6016-27.
  12. Maver-Biscanin M, Mravak-Stipetic M, Jerolimov V, Biscanin A. Fungicidal effect of diode laser irradiation in patients with denture stomatitis. *Lasers Surg Med.* 2004; 35(4):259-62.
  13. Queiroga AS, Trajano VN, Lima EO, Ferreira AF, Queiroga AS, Limeira FA Jr. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp by different doses of low power laser light. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2011; 8(4):332-6.
  14. Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, Mylonakis E et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces In vivo pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(1):445-51.
  15. Pereira MSV, Siqueira-Júnior JP, Rodrigues E, Cavalcanti ML, Nascimento AE, Campos-Takaki GM. Evaluation of ultrastructural changes induced by ofloxacin associated with cephalexin against human and bovine strains of *Staphylococcus aureus* during post antibiotic effect (PAE). *Int J Pharmacol Res.* 2014; 1(1):15-21.
  16. Dai T, Bil de Arce VJ, Tegos GP, Hamblin MR. Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(12):5710-7.
  17. Machado-de-Sena RM, Corrêa L, Kato IT, Prates RA, Senna AM, Santos CC et al. Photodynamic therapy has antifungal effect and reduces inflammatory signals in *Candida albicans*-induced murine vaginitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014; 11(3):275-82.
  18. Calzavara-Pinton P, Rossi MT, Sala R, Venturini M. Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochem Photobiol.* 2012; 88(3):512-22.
  19. Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Rev Med Chem.* 2009; 9(8):974-83.
  20. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2001; 144(2):274-8.
  21. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol.* 2011; 87(4):895-903.
  22. Mardh PA, Rodrigues AG, Genç M, Novikova N, Martinez-de-Oliveira J, Guaschino S. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis – a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. *Int J STD AIDS.* 2002; 13(8):522-39.
  23. Gomes-de-Elvas AR, Palmeira-de-Oliveira A, Gaspar C, Gouveia P, Palmeira-de-Oliveira R, Pina-Vaz C. et al. In vitro assessment of gentian violet anti-candida activity. *Gynecologic Obstet Invest.* 2012; 74(2):120-4.
  24. Maley AM, Arbiser JL. Gentian violet: a 19th century drug re-emerges in the 21st century. *Exp Dermatol.* 2013; 22(12):775-80.
  25. Jurevic RJ, Trabolsi RS, Mukherjee PK, Salata RA, Ghanoum MA. Identification of gentian violet concentration that does not stain oral mucosa, possesses anti-candidal activity and is well tolerated. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011; 30(5):629-33.
  26. Traboulsi RS, Mukherjee PK, Chandra J, Salata RA, Jurevic R, Ghanoum MA. Gentian violet exhibits activity against biofilms formed by oral candida isolates obtained from HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(6):3043-45.
  27. Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2001; 12(2):104-8.
  28. Perni S, Prokopovich P, Pratten J, Parkin IP, Wilson M. Nanoparticles: their potential use in antibacterial photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 2011; 10(5):712-720.
  29. Sharon V, Fazel N. Oral Candidiasis and Angular Cheilitis. *Dermatol Ther.* 2010; 23(3):230-42.

30. Carvalho GG, Felipe MP, Costa MS. The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions. *J Microbiol.* 2009; 47(5):619-23.
31. Atalay MA, Koc AN, Demir G, Sav H. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated from blood cultures. *Niger J Clin Pract.* 2015; 18(1):52-5.
32. Morales DK, Grahl N, Okegbe C, Dietrich LEP, Jacobs NJ, Hogan DA. Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *MBio.* 2013; 4(1):e00526-12.
33. Ford CB, Funt JM, Abbey D, Issi L, Guiducci C, Martinez DA et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *Elife.* 2015; 4:e00662.
34. Neppelenbroek KH, Machado AL, Pavarina AC, Massucato EM, Colombo AL, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. *J Rehabil Oral.* 2008; 25(3):232-44.
35. Vazquez JA, Sobel JD. Mucosalcandidiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2001; 16(4):793-820.
36. 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; 93(2):155-60.
37. Oliveira CS, Turchiello R, Kowaltowski AJ, Indig GL, Baptista MS. Major determinants of photoinduced cell death: subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(4): 824-33.
38. Mima EG, Pavarina AC, Ribeiro DG, Dovigo LN, Vergani CE, Bagnato VS. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* SSP. on dentures: in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(12):827-33.
39. 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.* 2014; 11(4):452-9.
40. 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; 83(1):34-8.

#### CONTRIBUCIONES

**Rachel Christina de Queiroz Pinheiro, Matheus Sousa Peixoto, Daliana Queiroga de Castro Gomes y Maria do Socorro Vieira Pereira** actuaron en el desarrollo de la metodología, adquisición de los datos y construcción del artículo. **Isabella Lima Arrais Ribeiro** contribuyó en el análisis estadístico y redacción. **Cacio Moura-Netto** participó en el concepto y aprobación de la versión final para publicación.

#### Cómo citar este artículo (Vancouver)

Pinheiro RCQ, Peixoto MS, Ribeiro ILA, Gomes DQC, Pereira MSV, Moura Netto C. Efecto fotosensibilizador in vitro de la violeta de genciana en la terapia fotodinámica sobre *Candida albicans*. *REFACS* [Internet]. 2018 [citado en *agregar día, mes y año de acceso*];6(2):158-165. Disponible en: *agregar link de acceso*. DOI: *agregar link del DOI*.

#### Cómo citar este artículo (ABNT)

PINHEIRO, R. C. Q. et al. Efecto fotosensibilizador in vitro de la violeta de genciana en la terapia fotodinámica sobre *Candida albicans*. *REFACS*, Uberaba, MG, v. 6, n. 2, p. 158-165, 2018. Disponible en: <*agregar link de acceso*>. Accedido en: *agregar día, mes y año de acceso*. DOI: *agregar link del DOI*.

#### Cómo citar este artículo (APA)

Pinheiro, R. C. Q.; Peixoto, M. S.; Ribeiro, I. L. A.; Gomes, D. Q. C.; Pereira, M. S. V. & Moura Netto, C. (2018). Efecto fotosensibilizador in vitro de la violeta de genciana en la terapia fotodinámica sobre *Candida albicans*. *REFACS*, 6(2), 158-165. Recuperado en: *agregar día, mes y año de acceso* de *agregar link de acceso*. DOI: *agregar link del DOI*.