



Revista Eugenio Espejo
ISSN: 1390-7581
ISSN: 2661-6742
revistaeugenioespejo@unach.edu.ec
Universidad Nacional de Chimborazo
Ecuador

Terapia fotodinámica antimicrobiana sobre Candida albicans en superficies acrílicas de prótesis dentales. Estudio in vitro

Jarrín Ríos, María Alejandra; Caicedo Breddy, María Fernanda; Garrido Villavicencio, Pablo Rubén; Cepeda Inca, Héctor Eduardo

Terapia fotodinámica antimicrobiana sobre Candida albicans en superficies acrílicas de prótesis dentales.
Estudio in vitro

Revista Eugenio Espejo, vol. 16, núm. 3, 2022
Universidad Nacional de Chimborazo, Ecuador

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=572872037008>

DOI: <https://doi.org/10.37135/ee.04.15.08>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 3.0 Internacional.



Terapia fotodinámica antimicrobiana sobre *Candida albicans* en superficies acrílicas de prótesis dentales. Estudio *in vitro*

Antimicrobial photodynamic therapy on *Candida albicans* on acrylic surfaces of dental prostheses. In vitro study

María Alejandra Jarrín Ríos

Universidad Central del Ecuador, Ecuador

 <https://orcid.org/0000-0002-6358-9962>

DOI: <https://doi.org/10.37135/ee.04.15.08>

Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=572872037008>

Maria Fernanda Caicedo Breddy

Universidad Central del Ecuador, Ecuador

 <https://orcid.org/0000-0002-3118-196>

Pablo Ruben Garrido Villavicencio

Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Universidad de Sao Paulo, Brasil

 <https://orcid.org/0000-0002-5223-1017>

Héctor Eduardo Cepeda Inca

Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Universidad de Sao Paulo, Brasil

hecepeda@uce.edu.e

 <https://orcid.org/0000-0003-0567-6096>

Recepción: 19 Enero 2022

Aprobación: 24 Marzo 2022

RESUMEN:

Frecuentemente, se han encontrado especies del género *Candida* en la microbiota oral de los humanos. **Objetivo:** comparar la efectividad antimicrobiana de la terapia fotodinámica sobre las cepas de *Candida albicans* en superficies acrílicas para prótesis dentales, empleando láser con 660nm de longitud de onda y azul de metileno como agente fotosensibilizante, con respecto a otros métodos terapéuticos. **Metodología:** estudio *in vitro*, empleando 60 discos de acrílico de termocurado sumergidos en una suspensión de *C. albicans*, generando una simulación de biofilm sobre la superficie de una prótesis dental. Luego se conformaron cinco grupos al azar de 12 unidades a los que se aplicó diferentes procedimientos terapéuticos: G1 (suero fisiológico), G2 (clorhexidina al 0,12%), G3 (nistatina en solución tópica en 0,001ml/ml), G4 (azul de metileno al 0,005% + láser diodo con $\lambda=660\text{nm}$, 100mW, 32J/cm.) y G5 (azul de metileno 0,01% + láser diodo con $\lambda=660\text{nm}$, 100mW, 321J/cm.). **Resultados:** Se observó una diferencia estadísticamente significativa al comparar los grupos G4 y G5 con respecto a los G1 y G3 ($p<0,05$). **Conclusión:** la eficacia en la reducción del número de UFC viables de *C. albicans* resultó superior en los grupos donde se empleó radiación láser con una longitud de onda de 660nm con diferentes concentraciones de azul de metileno. El uso de nistatina y de suero fisiológico tuvieron los menores valores de eficacia.

PALABRAS CLAVE: fotoquimioterapia, terapia por láser, candidiasis bucal, prótesis dental.

ABSTRACT:

Species of the genus *Candida* are frequently found in the oral microbiota of humans. **Objective:** to compare the antimicrobial effectiveness of photodynamic therapy on *Candida albicans* strains on acrylic surfaces for dental prostheses by using a 660nm wavelength laser and methylene blue as a photosensitizing agent, with respect to other therapeutic methods. **Methodology:** in vitro study, using 60 thermosetting acrylic discs immersed in a suspension of *C. albicans*, generating a biofilm simulation on the surface of a dental prosthesis. After that, five random groups of 12 units were formed to apply them different therapeutic procedures: G1 (saline solution), G2 (chlorhexidine 0.12%), G3 (nystatin in topical solution at 0.001ml/ml), G4 (0.005% methylene blue + diode laser with $\lambda=660\text{nm}$, 100mW, 32J/cm.) and G5 (0.01% methylene blue + diode laser with $\lambda=660\text{nm}$, 100mW, 321J/cm.). **Results:** a statistically significant difference was observed when comparing groups G4 and G5 with respect to G1 and G3 ($.<0.05$).

Conclusion: the efficacy in reducing the number of viable *C. albicans* CFU was higher in the groups where laser radiation with a wavelength of 660nm was used with different concentrations of methylene blue. The use of nystatin and physiological saline had the lowest efficacy values.

KEYWORDS: Photochemotherapy, Laser Therapy, Candidiasis, Oral, Dental Prosthesis.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Candida* se hallan frecuentemente en la microbiota oral de los humanos.⁽¹⁾ En la mayoría de los individuos, este microorganismo reside como un huésped inofensivo; sin embargo, ante factores predisponentes, pueden causar infecciones que van desde lesiones superficiales de la mucosa hasta procesos sistémicos que amenazan la vida.^(2,3,4)

Candida albicans es un hongo dimórfico capaz de evadir los mecanismos de defensa del huésped, permitiéndole colonizar el epitelio a través de la secreción de enzimas hidrolíticas tales como: proteinasas y fosfolipasas; lo que produce metabolitos ácidos, otras sustancias tóxicas y la transición fenotípica de blastosporas a hifas o pseudohifas.^(1,5) Esta capacidad de adherencia favorece el desarrollo de estomatitis por prótesis dental (EPD) que se puede agravar ante elevado consumo de azúcar.⁽³⁾

El uso de prótesis dentales acrílicas se relaciona con infecciones por *Candida albicans*, principalmente, si existe potencial contaminación por exceder la vida útil de la prótesis y una deficiente higiene oral.⁽¹⁾

Este tipo de infección dificulta la alimentación debido a la presencia de sangrado y exudado, acompañado de ardor, dolor, halitosis, gusto desagradable y sequedad bucal.⁽⁴⁾

El control de las infecciones por *Candida albicans* resulta difícil por su naturaleza multifactorial.⁽⁴⁾ El tratamiento más empleado se basa en la medicación mediante antifúngicos en diferentes presentaciones: tabletas, enjuagues y antisépticos para la desinfección de la prótesis. Aunque, se exploran otros tratamientos por el incremento de la resistencia microbiológica a los medicamentos de elección.^(5,6)

La terapia fotodinámica (PDT, por sus siglas del inglés Photodynamic Therapy) constituye un procedimiento terapéutico alternativo para la inactivación de microorganismos patógenos.^(6,7) Este consiste en la administración de un agente fotosensibilizante que se irradia con una longitud de onda específica, produciéndose especies reactivas de oxígeno (ROS) que provocan la muerte del hongo.^(8,9)

Existen dos mecanismos para la producción de ROS:⁽¹⁰⁾

- Tipo I, mediante transferencia de electrones al O₂ que produce: superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo.

- Tipo II, a través de transferencia de energía que produce oxígeno singlete.

Al acumularse o atravesar la membrana citoplasmática, el agente fotosensibilizador provoca daños irreversibles en las bacterias después de la irradiación. La efectividad de la PDT dependerá de la longitud de onda aplicada, la concentración del agente fotosensibilizador, el tiempo de irradiación, la potencia de salida, el modo de irradiación (continuo o pulsado) y la convergencia del haz de luz.^(6,9)

Así, en el uso de PDT se emplea fuentes de luz roja (630nm-700nm) por la capacidad de las longitudes de onda larga para penetrar efectivamente los tejidos biológicos, siendo preferible el empleo de agentes fotosensibilizadores tales como: azul de metileno (AM), azul de toluidina (AT) y el verde de malaquita (VM). Por otra parte, las fuentes de luz azul (380nm-520nm), utilizando como fotosensibilizadores: rosa de bengala (RB), eosina (EOS) y eritrosina (ERI).⁽⁹⁾

Considerando lo expuesto, la presente investigación tuvo el propósito de comparar la efectividad antimicrobiana de la terapia fotodinámica sobre las cepas de *C. albicans* en superficies acrílicas para prótesis dentales, empleando láser con 660nm de longitud de onda y azul de metileno como agente fotosensibilizador, con respecto a otros métodos terapéuticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se prepararon 60 discos de resina acrílica termopolimerizable de color rosado, el que se utiliza habitualmente para la elaboración de prótesis dentales (MARCHE Termocurable, Santiago de Chile) de 10 mm de diámetro y 3 mm de espesor, siguiendo las instrucciones del fabricante: proporción de polvo/líquido 3.2:1 v/v). Este procedimiento se realizó siguiendo la técnica de moldeo por compresión termopolimerizada, a partir de patrones de cera para modelar (Cera Reus S.A Spain) con las mismas dimensiones, siendo enmuflados con yeso ISO tipo 3 (RapidFlaskTM Whip Mix Louisville Kentucky) con una relación de agua polvo de 35ml/100g. El proceso térmico fue a 70°C durante 90 minutos y luego a 100°C por 30 minutos, para dejarse enfriar durante 30 minutos. Cada muestra se pulió con papel de lija 600 para simular una superficie rugosa y se verificó las dimensiones de los discos mediante un paquímetro digital (TOTAL, China). Finalmente, las muestras se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Activación de las cepas

La activación de las cepas de *Candida albicans* se realizó en una cámara de flujo laminar (FLOW 100V), inoculando con un asa en un medio de enriquecimiento sólido Sabouraud y uno líquido de tripticasa soya; se dejó cultivar en una estufa (THELCO Thermo Electron Corporation USA) a 37°C por 48 horas y se evaluó el crecimiento por medición de la turbidez de 0,5 en la escala de Mc Farland, equivalente a 1x10⁶ unidades formadoras de colonias por mililitro.

Conformación de los grupos

El microorganismo activado se inoculó en los discos de acrílico colocando 2ml de caldo de cultivo en pocillos individuales y se llevó a incubación en una estufa (THELCO Thermo Electron Corporation USA) a 37°C por 48 horas. Después del tiempo de incubación, cada uno de los discos fueron colocados en pocillos individuales de cajas de cultivo estériles según los grupos de estudio, este tipo de muestra fue aleatorio simple (n=12), quedando conformados cinco grupos en los que se aplicó 2 ml de cada sustancia estudiada durante 5 minutos: G1 suero fisiológico, G2 clorhexidina al 0,12%, G3 Nistatina al 0,001 ml/ml, mientras que, en G4 y G5 se colocó azul de metileno al 0,005% y 0,01%, respectivamente. Posterior, se eliminaron los excesos de colorante y se irradiaron las superficies rugosas con un láser el diodo Therapy XT (DMC, São Carlos/SP, Brazil) λ 660nm, diámetro de la fibra 600um con los siguientes parámetros: 0,1W, 9J, 90s, área del spot 0,028cm. y una dosis de energía de 321J/cm. a 1mm de distancia de forma perpendicular en modo continuo.

Para garantizar que la energía sea constante en cada grupo, se verificó la potencia del láser mediante un radiómetro (DMC, São Carlos/SP, Brazil) antes de realizar cada aplicación.

Siembra de los cultivos

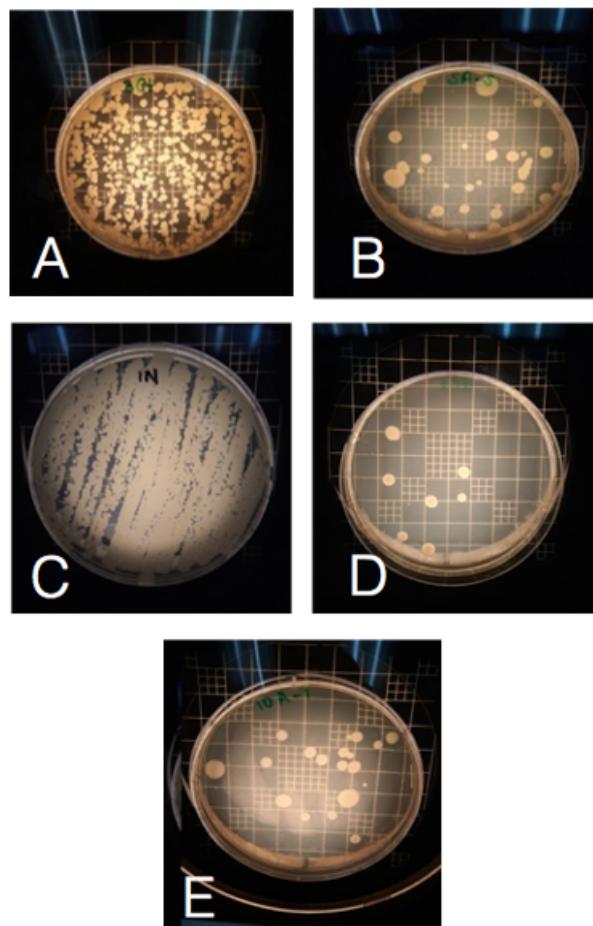
A continuación, se hisopó la parte rugosa de cada disco, procediendo a inocular en medio de cultivo Sabouraud a 37°C por 48 horas.

Las cepas de *Candida albicans* se cultivan con mayor rapidez en medios artificiales; así, durante las primeras 24 horas ya se puede observar colonias de aspecto cremoso, brillante y de color blanco y entre las 48 y 72 horas se obtiene un nivel muy alto de desarrollo. Aun sin la presencia de oxígeno, la incubación puede realizarse de 25 a 37°C con un nivel de riesgo de debilitar su crecimiento.⁽¹¹⁾

Conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC)

Transcurridas 48 horas, se realizó el conteo de las UFC de cada una de las muestras para verificar el nivel de crecimiento del microorganismo por cuadrantes, utilizando un contador de colonias de campo oscuro con iluminación uniforme de las placas con un aumento de 3x (QUEBEC Darfield Colony Counter 220V/50Hz Reichert Technologies EE.UU.) (figura 1). Los datos relativos a estas se agruparon en cuatro rangos de escala para su mejor procesamiento según grupos experimentales: 0 a 99, 100 a 199, 200 a 300 y mayor que 300.

Figura 1. Variación de resultados en el conteo de los diferentes grupos: 1A (suero fisiológico), 1B (clorhexidina), 1C (nistatina 0,001 ml/ml), 1D (AM 0,005%) 1E (AM 0,01%)



Los datos recolectados fueron organizados en una base elaborada en el programa Microsoft Excel para su posterior procesamiento y análisis, mediante estadísticas descriptivas de frecuencia relativa e inferenciales no paramétricas de comparación (Kruskall Wallis).

Los investigadores siguieron los principios de la investigación científica, cumpliendo con las medidas de seguridad para el trabajo en el laboratorio de microbiología y la obtención de los correspondientes permisos. El estudio contó con el aval de la carrera de Odontología de la Universidad Central del Ecuador.

RESULTADOS

El proceso investigativo posibilitó comparar la efectividad de diversos métodos terapéuticos de desinfección de superficies acrílicas de prótesis dentales contaminadas por *Candida albicans*.

TABLA 1
Comparación de los grupos experimentales por pares según prueba de Kruskall Wallis

Grupos	<i>p>(0,05)</i>	Desviación estandar
G4xG5	1,000	5,981
G4xG2	0,905	5,981
G4xG1	0,006*	5,981
G4xG3	0,006*	5,981
G5XG2	1,000	5,981
G5xG1	0,013*	5,981
G5xG3	0,013*	5,981
G2XG1	0,841	5,981
G2XG3	0,841	5,981
G1XG3	1,000	5,981

* Diferencias estadísticamente significativas

*Diferencias estadísticamente significativas

Los resultados obtenidos mostraron que entre ambos grupos donde se aplicó la terapia fotodinámica (G4 y G5) no existió diferencias significativas, contrariamente a los observado al comparar los datos de estos con respecto a los grupos en los que se aplicó suero fisiológico y nistatina (G1 y G3, respectivamente), con valores (*p*<0,05) (tabla 1).

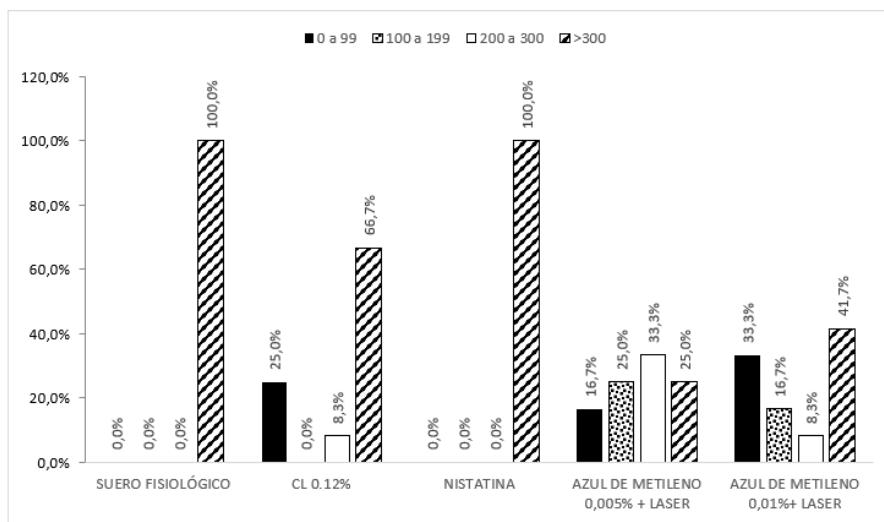


FIGURA 2
Comparación de los grupos atendiendo a rangos de los valores de UFC

Las muestras presentaron un mayor crecimiento de *Cándida albicans* fueron en las que se utilizó suero fisiológico (G1) y nistatina (G3), con un 100% de los valores en el rango de > 300 ufc, observándose la mejor efectividad en los grupos donde se aplicó la terapia fotodinámica (G4 y G5) (figura 2).

DISCUSIÓN

En otras investigaciones^(12,13) también se reportó adecuados niveles de eficacia de la PDT con el uso de AM como agente fotosensibilizador en infecciones bacterianas y fúngicas en afectaciones dermatológicas, gástricas y de la cavidad oral. Aunque, debe destacarse que los reportes publicados mencionan que ni el agente fotosensibilizante ni la irradiación por sí solos tienen un efecto antimicrobiano significativo en cepas de *C. albicans*.^(10,13,14)

En la PDT, las ROS (anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrogeno y especialmente el oxígeno singuleto) son las que generan el estrés oxidativo. Estas alteran la integridad celular, dañando el ADN, los lípidos, las proteínas y otras macromoléculas, lo que causa la muerte por necrosis o apoptosis. Además, cuando son endógenas propician una transición alcalina del ADN, provocando daños en las purinas y/o pirimidinas y roturas dobles o sencillas en las cadenas de nucleótidos con un efecto tóxico y mutagénico sobre las células de *C. albicans*.^(15,16)

La dosificación del fotosensibilizador constituye un factor determinante en la eficacia de la PDT.⁽¹⁷⁾ Esta se realiza atendiendo a sensibilidad y concentración, considerando los parámetros de irradiación con luz y concentración de oxígeno molecular disponible.^(14,17,18)

Este estudio, la irradiación con láser y AM como fotosensibilizador fue el método más eficaz en la reducción de UFC de *C. albicans*, empleando longitudes de onda de 660nm tal como recomienda Nuñez.⁽¹⁷⁾

Pupo⁽¹⁴⁾ señala que el número de UFC de *C. albicans* iniciales puede reducirse hasta en un 62,18% mediante la aplicación de PDT con AM. Por su parte, Wilson y Mia⁽¹⁸⁾ hallaron una disminución del 42%, mientras que Sousa et al.⁽¹³⁾ reportaron un 88,6%; además de otros autores^(16,19) que informan el efecto fungicida significativo de este método en *C. albicans*.

Pasyechnikova et al.⁽²⁰⁾ considera que una mayor concentración del agente fotosensibilizador pudiera generar agregados, alterando su banda de absorción, lo que se ha sido descrito con sustancias como el AM y el azul de toluidina (AT); Aunque, otro criterio indica que concentraciones elevadas pueden crear una barrera que impediría la difusión adecuada de la luz.⁽¹⁷⁾

Con respecto al uso de nistatina como antifúngico en infecciones cutáneas y de la mucosa originadas por *Candida albicans*, esta actúa uniéndose a los esteroles de su membrana celular, afectando su permeabilidad, lo que provoca la eliminación de elementos intracelulares vitales.^(15,21) Así, contrariamente a los resultados obtenidos en la presente investigación, Bakhtiari et al.⁽²²⁾ reportaron un efecto favorable que la nistatina a una concentración de 0.5 µg/ml.

La clorhexidina es un detergente catiónico soluble en agua que reacciona con los lipopolisacáridos y fosfolípidos de la membrana celular, inhibiendo la utilización de oxígeno y causando la muerte celular.⁽²¹⁾ Los hallazgos del presente estudio mostraron la efectividad de esta sustancia fue superior a la nistatina para disminuir la viabilidad de las UFC de *C. albicans*.

CONCLUSIONES

En ambos grupos donde se empleó la terapia fotodinámica con diferentes concentraciones de azul de metileno y la radiación láser con una longitud de onda de 660nm, la eficacia en la reducción del número de UFC viables de *C. albicans* sobre superficies acrílicas fue superior al uso de otros métodos mediante la aplicación de sustancias antifúngicas. Los grupos uno (suero fisiológico) y tres (nistatina) constituyeron los métodos con menores valores de eficacia al respecto.

Agradecimientos: a los funcionarios del laboratorio de microbiología de la Facultad de la Bioquímica de la Universidad Central del Ecuador por su valioso aporte en esta investigación.

Conflicto de intereses: los autores declaran que no existe.

Declaración de contribución: existió una participación homogénea y activa en la investigación, recolección de información científica actualizada y la redacción del artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barrancos-Mooney JP. Operatoria dental: integración clínica. 4ta Edición ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana; 2006.
2. Montelongo-Jauregui D, Lopez-Ribot J. Candida Interactions with the Oral Bacterial Microbiota. *J of Fungi [Internet]*. 2018 [2021 Nov 6]; 4(4): 122-137. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2309-608X/4/4/122>. <http://dx.doi.org/10.3390/jof4040122>.
3. Di Cosola M, Cazzolla AP, Charitos IA, Ballini A, Inchingolo F, Santacroce L. Candida albicans and Oral Carcinogenesis. A Brief Review. *J of Fungi [Internet]*. 2021 [2021 Dic 28]; 7(6): 476-489. Disponible en: <http://www.mdpi.com/2309-608X/7/6/476.htm>. <http://dx.doi.org/10.3390/jof7060476>.
4. Xiao J, Grier A, Faustoferri RC, Alzoubi S, Gill AL, Feng C, et al (2018). Association between Oral Candida and Bacteriome in Children with Severe ECC. *J Dental Research [Internet]*. 2018 [2021 Nov 11]; 97(13): 1468–1476. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0022034518790941>. <https://doi.org/10.1177/0022034518790941>.
5. Amador-García A, Gil-García MC, Monteoliva-Díaz L. Dinámica del proteoma de Candida albicans tras la interacción con macrófagos y la exposición a agentes inductores del estrés [tesis en Internet]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2019 [2021 Dic 21]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/59733/1/T41881.pdf>.
6. Otálora-Valderrama S, Herrero-Martínez JA, Hernández-Torres A, Moral-Escudero E, Gómez-Gómez J, Segovia-Hernández M. Micosis sistémicas en pacientes no inmunocomprometidos. *Medicine [Internet]*. 2018 [2021 Dic 14]; 12(57): 3349-3356. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030454121830132X>. <https://doi.org/10.1016/j.med.2018.05.002>.
7. Lee X, Cajas N, Gómez L, Vergara C, Ivankovic M, Astorga E. Ocurrencia de levaduras del género Candida y estomatitis protésica antes y después del tratamiento rehabilitador basado en prótesis removible. *Rev Clín Periodonc Implantol y Rehabil Oral [Internet]*. 2015 [2021 Sep 11]; 8(1): 31-37. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0718539115000105?via%3Dihub>. <https://doi.org/10.1016/j.piro.2015.02.005>.
8. Bulacio L, Ramadán S, Dalmaso H, Luque A, Sortino M. Optimización de variables en ensayos de actividad antifúngica fotodinámica frente a especies de Candida. *Rev Argentina Microbiol [Internet]*. 2021 [2021 Dic 6]; 53(4): 287-291. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754121000134>. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.12.006>.
9. Urbina-Salazar AR, Inca-Torres AR, Urbina-Salazar BA, Inca-Torres VF, Bautista J. Aqueous Extracts of Mushrooms Enriched with Ergothionein with Antioxidant Activity and Its Effect on Human Dermal Fibroblasts UV irradiated. *ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of STEAM [Internet]*. 2021 [2021 Dic 12]; 1(3): 1072-1080. Disponible en: <https://knepublishing.com/index.php/epoch/article/view/9533/15945#info>. <https://doi.org/10.18502/epoch.v1i3.953>.
10. Rolim J, Melo M, Guedes S, Albuquerque F, De Sousa J, Nogueira N, et al. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J of Photochem and Photobiol B: Biology [Internet]*. 2012 [2021 Dic 18]; 106(5): 40-46. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1011134411002181?via%3Dihub>. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.10.001>.
11. Negroni M. Microbiología Estomatológica. 2da Edición ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana; 2009.
12. Namvar MA, Vahedi M, Abdolsamadi H, Mirzaei A, Mohammadi Y, Jalilian FA. Effect of photodynamic therapy by 810 and 940 nm diode laser on Herpes Simplex Virus 1: An in vitro study. *Photodiagn and photodyn therap [Internet]*. 2019 [2021 Dic 21]; 25: 87-91. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1572100018302643?via%3Dihub>. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.11.011>.
13. Souza SC, Campos-Junqueira J, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, et al. Photosensitization of different Candida species by low power laser light. *J Photochem Photobiol B: Biology [Internet]*. 2006 [2021 Dic 19]; 83(1):

- 34-38. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1011134405002290?via%3Dihub>. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.12.002>.
14. Pupo YM, Gomes GM, Santos EB, Chavez L, Michel MD, et al. Susceptibility of *Candida Albicans* to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as photosensitizing dyes. *Acta Odontol Latinoam* [Internet]. 2011 [2021 Dic 2]; 24(2): 188-192. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2165318/>.
 15. Daliri F, Azizi A, Shirin M, Lawaf Sh, Rahimi A. In Vitro Comparison of the Effect of Photodynamic Therapy with Curcumin and Methylene Blue on *Candida albicans* Colonies. *Photodiagn and Photodyn Therap* [Internet]. 2019 [2021 Dic 5]; 26: 193-198. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1572100019300079?via%3Dihub>. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.03.017>.
 16. Guzel O, Kalkanci A, Unal E, et al. The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida* and *Staphylococcus* biofilms. *Turk J Med Sci* [Internet]. 2018 [2021 Dic 19]; 48(4): 873-879. Disponible en: <https://journals.tubitak.gov.tr/medical/vol48/iss4/25/>. <https://doi.org/10.3906/sag-1803-44>.
 17. Nuñez S. PDT-Terapia fotodinámica antimicrobiana na odontologia. Madrid: Elsevier; 2013.
 18. Wilson M, Mia N. Sensitization of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 1993 [2021 Dic 3]; 22(8): 354-357. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0714.1993.tb01088.x>. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1993.tb01088.x>.
 19. Fekrazad R, Ghasemi V, Poorsattar B, Shams-Ghahfarokhi M. In vitro photodynamic inactivation of *Candida albicans* by phenothiazine dye (new methylene blue) and Indocyanine green (EmunDo®). *Photodiagn Photodyn Therap* [Internet]. 2015 [2021 Nov 26]; 12(1): 52-57. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1572100014001690?via%3Dihub>. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.12.006>.
 20. Pasynchnikova N, Zborovskaya O, Kustrin T. In vitro photodynamic properties of methylene blue in a combination with laser illumination at 630 nm concerning *Candida albicans*. *Klin Oczna* [Internet]. 2009 [2021 Nov 18]; 111(1-3): 15-17. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19517838/>.
 21. de Farias, Buffon M, Cini R. Evaluación in vitro de la acción antifúngica del digluconato de clorhexidina y nistatina en el control del crecimiento de *Candida albicans*. *Visión Académica* [Internet]. 2003 [2021 Nov 15]; 4(2). Disponible en: <https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/535/448>. <https://doi.org/10.5380/acd.v4i2.535>.
 22. Bakhtiari S, Jafari S, Taheri JB, Kashi T, Namazi Z, Iman M, Poorberafeyi M. The Effects of Cinnamaldehyde (Cinnamon Derivatives) and Nystatin on *Candida Albicans* and *Candida Glabrata*. *Open Access Maced J Med Sci* [Internet]. 2019 [2021 Nov 20]; 7(7): 1067-1070. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6490497/#:~:text=In%20conclusion%2C%20although%20the%20cinnamaldehyde,as%20an%20effective%20medicinal%20plant>. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.245>.