

# EFEITO DO GERADOR DE ALTA FREQUÊNCIA SOBRE CULTURA DE *CANDIDA TROPICALIS*

## EFFECT OF HIGH FREQUENCY GENERATOR ON *CANDIDA TROPICALIS* CULTURE

Revista de Especialização em Fisioterapia - Vol 1 - n° 1 – Jul/Ago/Set – 2007

<sup>1</sup>Denise Rosa Higa, <sup>1</sup>Paula Chacha Cese, <sup>1</sup>Renata de Moura Marimon Falcão, <sup>2</sup>Andréia Chacha Cese, <sup>3</sup>Marilene Rodrigues Chang, <sup>4</sup>Fabio dos Santos Borges, <sup>5</sup>José Tadeu Madeira-Oliveira

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Fisioterapia Dermato-Funcional da Universidade Gama Filho (UGF) – Campo Grande - MS

<sup>2</sup>Farmacêutica Bioquímica

<sup>3</sup>Serviço de Microbiologia - Departamento de Infectologia - Hospital da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

<sup>4</sup>Fisioterapeuta, mestre em Ciências Pedagógicas

<sup>5</sup>Fisioterapeuta, mestre em Parasitologia

**Endereço para correspondência:** Denise Rosa Higa: Rua do Senai, nº 42, Vila Sobrinho, CEP: 79110-210, Campo Grande – MS; Tel. (67) 84118818; e-mail: denisehiga@ibestvip.com.br

### RESUMO

A alta frequência é mais um recurso fisioterapêutico que pode contribuir no tratamento de afecções cutâneas causadas por microrganismos, dentre eles o gênero *Candida*. O objetivo deste estudo foi demonstrar o efeito fungicida deste recurso sobre cultura de *Candida tropicalis in vitro*. Para isso, a alta frequência foi aplicada com eletrodo em forma de bico, com a técnica de faiscamento por 5 minutos sobre colônias isoladas em levedura. Foi realizada nova repicagem das colônias submetidas à aplicação do aparelho e da placa controle em placas estéreis para verificar crescimento de novas culturas após 48 horas. Verificamos que 90% das placas que foram submetidas à ação do aparelho de alta frequência não foram constatados crescimento de *Cândida tropicalis*, já na placa controle da pesquisa foi observado crescimento normal da *Cândida*. Concluímos que o aparelho gerador de alta frequência proporcionou um efeito fungicida frente à cultura de *Candida tropicalis in vitro*, sendo necessárias novas pesquisas para comprovar sua eficácia e utilidade em tratamentos dermatológicos *in vivo*, e assim ampliar e divulgar novas técnicas de tratamento da fisioterapia dermato-funcional.

**Palavras-chaves:** Alta frequência; *Candida tropicalis*; ozônio.

### ABSTRACT

The high frequency is one of the physiotherapeutic recourses that cam contribute on skin disorders treatment injured by microorganisms like the *Candida tropicalis*. The main objective of this study was demonstrating the fungicide effect of this recourse on “in vitro” cultures of *Candida tropicalis*. To reach our goal we have applied the beak shape electrode, using the technique that produces sparks for five minutes over yeast isolated colonies. A new sampling have been realized with the

colonies where we had already applied the high frequency and the control slab in sterile slabs to verify germination of new cultures after 48 hours, we have verified that in 90% of slabs that have been submitted to the high frequency action stopped germination *Candida tropicalis*, while on the control slab of this study have been observed normal growth of *Candida*. We have concluded that the high frequency generator provided fungicide effect over “in vitro” cultures of *Candida tropicalis*. New researches will be essential to prove the high frequency utility and efficiency on “in vivo” skin disorders, so we would be able of extend and spread the information about the new treatment technique of functional skin physiotherapy.

**Key-words:** high frequency; *Candida tropicalis*; ozone.

## INTRODUÇÃO

A utilização do aparelho gerador de alta frequência tem sido realizada há anos com finalidades anti-sépticas, bactericidas, fungicidas e germicidas pelos profissionais que trabalham com tratamentos faciais de limpeza e ou tratamento de pele embora não haja muitas pesquisas que comprovem sua ação.

O aparelho de alta frequência produz correntes alternadas que podem apresentar frequência entre 100.000 e 200.000 Hz, com uma tensão que oscila entre 25.000 e 40.000 V e uma intensidade da ordem de 100 mA<sup>[1]</sup>. Essas correntes são geradas por um dispositivo eletrônico que consta de vários circuitos transistorizados que transformam, retificam e posteriormente produzem correntes de alta frequência a partir da corrente elétrica de uso doméstico que se é provida através da rede<sup>[2]</sup>.

Um gerador de alta frequência apresenta normalmente um porta-eletrodo e diversos eletrodos de vidro que podem conter em seu interior um vácuo parcial (ar rarefeito) ou um gás (*Néon, Chenon, Argon*). A passagem da corrente provoca uma ionização das moléculas de gás, as quais, sobre o forte impacto energético, tornam-se fluorescentes. Uma de suas principais ações é a formação de ozônio sobre a superfície a qual é aplicado<sup>[2]</sup>.

A passagem de ondas eletromagnéticas por ar ou outros gases rarefeitos provoca a formação de ozônio, como acontece, por exemplo, na ozonosfera do nosso planeta (as ondas eletromagnéticas do sol passam pelo ar rarefeito da ozonosfera, gerando ozônio)<sup>[2]</sup>.

O ozônio (O<sub>3</sub>) é uma substância extremamente instável, e quando o aparelho de alta frequência é aplicado na superfície da pele ele se decompõe rapidamente em oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) e em oxigênio atômico (O). A grande ação desinfetante do ozônio reside na grande agressividade do oxigênio atômico nascente, que é liberado durante a decomposição do ozônio<sup>[2,3,4]</sup>. Seu mecanismo antimicrobiano ocorre por lise da membrana dos agentes após oxidação<sup>[5]</sup>, pelo seu alto potencial oxidativo (2,07 V)<sup>[3,4,6]</sup>.

Existem três técnicas de aplicação do aparelho de alta frequência: Efluviação ou aplicação direta do eletrodo sobre a pele realizando deslizamento; faiscamento ou aplicação à distância, com eletrodo a milímetros da pele que produz uma grande diferença de potencial entre este e a pele, tornando o ar um condutor de eletricidade; e saturação ou aplicação indireta com eletrodo em forma de barra metálica, o qual a pessoa tratada segura o porta-eletrodo e o eletrodo durante o tratamento<sup>[1,7]</sup>.

Segundo Benjamini<sup>[8]</sup>, todo organismo vivo está sujeito a uma contínua invasão por componentes do ambiente. Nosso corpo possui um sistema imune cuja função primordial é defender o organismo contra infecções causadas por microrganismos que, de alguma maneira, poderiam estabelecer-se em nossos corpos no intuito de garantir a sua sobrevivência.

As infecções fúngicas sistêmicas são importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunodeprimidos ou com outras condições predisponentes. A *Candida sp* faz parte da biota da pele, que em certas condições pode se tornar patogênica<sup>[9,10]</sup>. Vários desses agentes são

menos suscetíveis às drogas antifúngicas, um fato que tem justificado o tratamento destes pacientes<sup>[11]</sup>.

A candidíase é definida como micose devido a fungos leveduriformes do gênero *Candida*, classe *Saccharomycetes* da subdivisão *Ascomycotina*<sup>[12]</sup>. As infecções agudas e crônicas mostram lesões na boca, faringe, pele, unha, sistema broncopulmonar, intestinal e perianal, ocasionalmente, endocardite, meningites ou infecções em outras localizações<sup>[13]</sup>.

Existem fatores predisponentes para desenvolvimento da doença: Alterações metabólicas, utilização de alguns fármacos (quimioterápicos, antibióticos e corticoesteroides) e doenças debilitantes<sup>[13]</sup>.

Tendo em vista o surgimento e crescimento da especialidade dermato-funcional, assim como da divulgação de técnicas de tratamento pouco conhecidas no meio fisioterapêutico, e devido à escassez de literatura e de estudos relacionados ao assunto, este trabalho objetivou demonstrar o efeito fungicida do aparelho de alta frequência na cultura de *Candida tropicalis in vitro*.

## METODOLOGIA

Foi coletada amostra do fungo *Candida tropicalis* de pacientes internados no Hospital da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Campo Grande) acometidos por micose de pele e onicomicose de unha.

Firmou-se o diagnóstico de candidíase mediante exame direto clarificado com hidróxido de potassa a 20% em solução aquosa de DMSO, por visualização de leveduras e/ou pelo menos dois crescimentos, ou seja, duas sementeiras do mesmo material, em culturas realizadas em meio de Agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol<sup>[14,15,16]</sup>.

Para a identificação das espécies de levedura do gênero *Candida* isoladas utilizamos placas com meio cromogênico — Chromagar *Candida*<sup>®</sup>, (Probac do Brasil<sup>®</sup>, São Paulo). Após sementeira da cepa nesse meio houve alteração da coloração da colônia de acordo com a espécie de *Candida* isolada. Após 48 horas de incubação a 30-37°C, foi possível a identificação de: *Candida albicans*, que se tornou esverdeada, *Candida krusei*, rósea, *Candida tropicalis*, azul-acinzentada, e as demais espécies, róseo-esbranquiçadas<sup>[14,16]</sup>. Assim conseguimos identificar e isolar a colônia de *Candida tropicalis* para que fosse realizada a pesquisa.

Em primeiro foi preparado o meio de cultura para fazer os repiques das cepas. O meio usado foi o Agar Sabouraud do laboratório Sanofi Diagnostic Pasteur onde, seguindo as instruções do fabricante, para cada 1 litro de água destilada foi usado 65g de Agar. Foram preparados 500 ml para aproximadamente 50 placas de Petri estéreis e descartáveis de 5 cm de diâmetro.

A solução foi colocada no forno de microondas por cerca de 6 minutos na potência máxima até sua diluição ficar totalmente homogênea e daí foi colocada em um Becker, lacrando-se a boca com fita crepe indicadora. O mesmo foi levado à autoclave em temperatura máxima atingindo 120°C. Atingido esta temperatura, foi colocado em temperatura média e deixado por mais 15 minutos para se diminuir a pressão e assim ser aberta a autoclave.

Após retirado da autoclave, o Agar, em estado líquido, foi despejado nas placas de *Petri* dentro da capela previamente ligada com a luz ultravioleta, para evitar contaminação do meio. Após esfriar o Agar e estar na forma sólida, a placa foi lacrada com Parafilm<sup>®</sup>. Após 24 horas, foram repicadas as cepas em 11 placas, sendo uma placa o grupo controle da pesquisa, e as outras dez placas foi aplicado o aparelho de alta frequência. A repicagem foi realizada com alça de platina em anel, sendo disseminado o material em 3 quadrantes da placa.

O inóculo foi disseminado sucessivamente em estrias com movimentos de cima para baixo em cada quadrante, onde a alça foi esterilizada para a terceira inoculação. A finalidade desta técnica foi

diluir o inoculo suficiente na superfície do meio para se obter colônias bem isoladas, assim a colônia pôde ser individualmente usada para aplicação do aparelho.

Depois de crescida as novas culturas nas placas semeadas (após 48 horas), foi aplicado o aparelho de Alta Frequência modelo Plus fabricado pela Tone Derm<sup>®</sup> com eletrodo de bico com ar rarefeito em seu interior, técnica de faiscamento sobre uma colônia isolada da placa com intensidade 8, sendo esta a intensidade mais baixa em que conseguimos produzir um ótimo faiscamento. A placa de *Petri* foi colocada sobre uma folha de papel alumínio para que houvesse um campo elétrico semelhante à pele, visto que o vidro da placa não é um bom condutor elétrico, e realizado uma aplicação por 5 minutos em cada placa, dentro da capela previamente ligada com luz ultravioleta para que não houvesse contaminação das placas pelo meio ambiente. Foi realizada nova repicagem das colônias submetidas à aplicação do aparelho e da placa controle em uma placa estéril, também dentro da capela, para verificar crescimento de novas culturas após 48 horas.

## RESULTADOS

Das 10 placas em que foram repicadas amostras das colônias submetidas à ação do aparelho de alta frequência, em nove delas não foi constatado crescimento de *Candida tropicalis*, e em uma delas houve pouco crescimento deste fungo; já a placa em que foi repicada amostra do grupo controle da pesquisa foi observado crescimento normal da *Candida tropicalis*.

Na placa em que houve crescimento de *Candida tropicalis* repicada a partir de uma placa submetida ao aparelho de alta frequência foi realizada nova aplicação, nas mesmas condições anteriores. Repicada essa colônia em nova placa, e aguardado o tempo de 48 horas, não foi observado crescimento de *Candida tropicalis*.

## DISCUSSÃO

Devido à instabilidade do ozônio, aproximadamente 3 segundos na fase gasosa, o que impede sua armazenagem, torna-se necessária sua geração *in situ*<sup>[17]</sup>. O ozônio pode ser produzido por três diferentes técnicas: exposição do oxigênio à luz ultravioleta, eletrólise do ácido perclórico e descarga eletroquímica<sup>[3,18]</sup>, sendo essa última a técnica utilizada para produção de ozônio pelo aparelho gerador de alta frequência desta pesquisa.

Dentre os diferentes processos de produção apresentados, o que utiliza descarga elétrica (também conhecido por efeito corona) é o mais utilizado pela maioria dos ozonizadores comerciais, principalmente pelo fato de se obter maior taxa de conversão de oxigênio em ozônio. Neste método, o ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre dois meios submetidos a uma elevada diferença de potencial (aproximadamente 10 kV). O rendimento deste processo varia entre 1 e 4% (m/m) e entre 6 e 14% (m/m) para sistemas alimentados por ar e oxigênio puro, respectivamente<sup>[3,18,19,20]</sup>. Neste estudo, a geração de ozônio se deu pela passagem de ar ambiente entre dois meios que apresentam uma diferença de potencial que oscilava entre 25 e 40 kV, garantindo, assim, um bom rendimento de ozônio, embora este não tenha sido calculado.

O ozônio é utilizado para esterilização de materiais em grande volume de forma eficaz, daí a proposta de utilização deste, com intuito fungicida sobre colônias que podem acometer a superfície cutânea. O aspecto biomédico do ozônio não foi amplamente discutido pela pequena quantidade de referencias bibliográficas do assunto e pela falta de estudos amplos e controlados. Os relatos sobre terapia com ozônio na literatura limitam-se a trabalhos e experiências isoladas, que não apresentam resultados controlados rigorosamente<sup>[5,21,22]</sup>. Estas pesquisas atribuem outras qualidades ao ozônio, tais como: estímulo à produção de citocinas, ativação de linfócitos T, melhora da oxigenação e do metabolismo celular por meio de vasodilatação e do aumento da resposta enzimática antioxidativa<sup>[1,5,23]</sup>, o que favorece ainda mais a utilização da ozonoterapia para o tratamento de afecções cutâneas provocadas tanto por fungos como por outros microrganismos.

O ozônio é capaz de reagir com uma numerosa classe de compostos orgânicos, devido, principalmente, ao seu elevado potencial de oxidação ( $E^0 = 2,08V$ ), superior ao de compostos reconhecidamente oxidantes, como  $H_2O_2$ <sup>[3,4,17,19]</sup>, o que significa uma maior eficácia terapêutica em comparação aos métodos atualmente utilizados.

O gás ozônio tem sido considerado um microbicida por agir sobre vírus, fungos e bactérias. Supõe-se que o ataque primário do ozônio se dê sobre a parede da célula do microrganismo e, depois, ao penetrar no interior da célula, este agente promove a oxidação dos aminoácidos e ácidos nucléicos. A lise celular depende da extensão destas reações<sup>[24,25]</sup>.

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela frequência elevada com que colonizam e infectam o hospedeiro humano, daí a opção por este fungo nesta pesquisa. Espécies de *Candida* são encontradas no tubo gastrointestinal em 20 a 80% da população adulta saudável. Alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade) e envelhecimento ou mais frequentemente, associadas a doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunodepressão induzida por atos médicos<sup>[26,27]</sup>.

A candidíase expressa a variedade de relações que ocorrem entre hospedeiro e microbiota autóctone, isto é, do comensalismo à doença sistêmica fatal<sup>[14,15]</sup>. Em hospitais terciários, o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, representando um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades<sup>[26,29]</sup>. Leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela colonização, por infecções fúngicas superficiais em imunocompetentes e por infecções sistêmicas em imunodeprimidos. A variedade de apresentações da doença leva a necessidade de utilização de diferentes métodos diagnósticos e esquemas terapêuticos<sup>[14,26,29]</sup>. Por isso, consideramos como relevante a eleição do gerador alta frequência como um destes diferentes métodos de tratamento por considerá-lo uma eficiente opção terapêutica para afecções superficiais, haja vista os resultados obtidos neste estudo.

São conhecidas cerca de dezessete espécies de *Candida* causadoras de micoses superficiais ou invasivas em seres humanos<sup>[26,27]</sup>. As principais espécies de interesse clínico são: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae*<sup>[26,30]</sup>.

*Candida albicans* é, sem dúvida, a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos e em casuísticas de todas as partes do mundo<sup>[26]</sup>. Essa predominância se observa na literatura tanto em pacientes imunocompetentes como em imunodeprimidos<sup>[14,32,33,34]</sup>. Esta espécie é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico<sup>[26,31]</sup>, daí um fator de desinteresse para sua eleição neste estudo.

A frequente ocorrência de infecções sistêmicas por espécies não *albicans* vem sendo documentada por diversos autores, em todas as partes do mundo. Debusk et al.<sup>[35]</sup> avaliando 106 episódios de candidemia em Michigan (EUA), ocorridos no período de 1986 a 1991, verificaram que antes de 1990, *Cândida albicans* era responsável por 60 a 80% dos isolados. As espécies não *albicans* predominaram após esse período, sendo *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* as mais frequentes<sup>[26,35]</sup>. Ainda, nos Estados Unidos da América, Pfaller<sup>[36]</sup>, reunindo amostras de *Candida* spp de cinquenta diferentes instituições, mostraram que espécies não *albicans* responderam por 49% do total de episódios de candidemia, sendo as espécies mais prevalentes: *C. glabrata* (17%), *C. parapsilosis* (16%), *C. tropicalis* (12%) e *C. krusei* (3%)<sup>[26,36]</sup>.

Muitas das espécies não *albicans* mais comumente isoladas são menos susceptíveis aos derivados azólicos, dificultando o tratamento dessas infecções. Embora a susceptibilidade das leveduras do gênero *Candida* aos antifúngicos disponíveis seja variável e previsível, nem sempre uma determinada amostra isolada segue o padrão geral<sup>[14]</sup>, sendo necessária a utilização de terapias novas, como a do aparelho desta pesquisa, que usa o ozônio como eficiente agente fungicida.

*Candida tropicalis* possui considerável potencial biológico como agente oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, quando há supressão da flora bacteriana pelo uso de antimicrobianos e danos na mucosa gastrointestinal. Este agente fúngico tem sido relatado como o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidemia em pacientes com neoplasias, sendo sua frequência maior em leucemias e menor em tumores sólidos<sup>[26,37]</sup>. Tendo em vista que tais pacientes estão debilitados e expostos a fortes tratamentos medicamentosos, a opção por uma terapia não invasiva e não medicamentosa, como o uso do ozônio ao nível da pele, torna-se uma ótima opção para o tratamento cutâneo causado pela *Candida*.

Em países de América Latina, particularmente o Brasil, esta espécie é extremamente frequente, mesmo entre pacientes não portadores de câncer, constituindo-se na segunda ou terceira principal causa de candidemia nas principais séries publicadas<sup>[26,38,39,40,41]</sup>.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho, ainda que baseados em amostragem pequena revelaram que o aparelho gerador de alta frequência propiciou efeito fungicida frente à cultura de *Candida tropicalis in vitro*, entretanto, entendemos que se fazem necessárias novas pesquisas para verificar sua eficácia e utilidade em tratamentos dermatológicos *in vivo*, e assim ampliar e divulgar novas técnicas de tratamento da fisioterapia dermato-funcional. Existe, ainda, a possibilidade da redução do tempo de contato e da intensidade utilizadas neste trabalho, tornando o tratamento mais rápido e vantajoso.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Miedes, W.R. *Electroestética*. Ed. Videocinco, Madri, 1999, p.68-75.
2. Winter, J.L.L. *Eletrocósmética*. Ed Vida Estética, 3ª Ed. 2001, p.185-206.
3. Almeida, E.; Assalin, M.R.; Rosa, M.A.; Durán, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. *Quim. Nova*, Out 2004; vol.27, n.5: p.818-824.
4. Cardoso, C.C.; Veiga, S.M.O.M.; Nascimento, L.C.; Fiorini, J.E.; Amaral, L.A. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Abr 2003; vol.23, n.1: p.59-61.
5. Lake, J.C.; Felberg, S.; Malavazzi, G.R.; Goulart, D.A.; Dantas, M.C.N.; Dantas, P.E.C. Efeito terapêutico da aplicação intra-ocular de ozônio em modelo experimental de endoftalmite por *Staphylococcus epidermidis* em coelhos. *Arq. Bras. Oftalmol.*, Ago 2004; vol.67, n.4: p.575-579.
6. Block, S.S. *Desinfection, sterilization and preservation*. 4. ed. Philadelphia, PA: Lea & Febiger, 1991: p. 1162.
7. Arnould-Taylor, W. *Princípios e prática de fisioterapia*. Ed. ArtMed, 4ª Ed., 1999: p. 143-144
8. Benjamini, E.; Coico, R.; Sunshine, G. *Imunologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002: p. 288.
9. Penna, G.O. *Doenças infecciosas e parasitárias: aspectos clínicos, de vigilância epidemiológica e de controle - Guia de bolso*. Brasília Ministério da Saúde: Fundação nacional da Saúde, 1999.
10. Hamill, R.J.; Hollander, H. *Infectious Diseases: Mycotic*. In: Tierney Jr. L.M., McPhee S.J., Papadakis M.A., editors. *Current Medical Diagnosis and Treatment*. 36th ed. Stamford: Appleton & Lange; 1997: p 1356-1357.

11. Miranda, E.T.; Silva, R.A.M.; Fusco-Almeida, A.M.; Melhem, M.C.S.; Pukinskas, S.R.B.S.; Mendes-Giannini, M.J.S. Epidemiologia de candidíase hospitalar: importância da identificação específica. *Revista Ciência farmacêutica*; 24(1), 2003: p.39-45.
12. Rey, L. *Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde*. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
13. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. *Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle de infecção hospitalar. Divisão de controle de infecção hospitalar/SNAS*. Brasília, 1991.
14. Crocco, E.I.; Mimica, L.M.J.; Muramatu, L.H. et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *An. Bras. Dermatol*; dez 2004, vol.79, n.6: p.689-697.
15. Paula, C.R. Candidíases. In: Zaitz C, Campbell I, Marques AS, et al. *Compêndio de Micologia Médica*. Rio de Janeiro: Medsi; 1998: p. 99-107.
16. Lacaz C.S.; Porto, E.; Marins, J.E.C.; et al. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. São Paulo: Sarvier; 2002: p. 918-990.
17. Robinson, T.; McMullan, G.; Marchant, R; Nigam, P.; *Bioresour. Technol.* 2001, 77, 247.
18. Balakrishnan, P. A.; Arunagiri, A.; Rao, P. G.; *J. Electrostat.* 2002, 56,77
19. Kunz, A.; Freire, R. S.; Rohwedder, J. J. R.; Durán, N.; Mansilla, H.; Rodriguez, J.; *Quim. Nova* 1999, 22, 425.
20. Lin, S. H.; Yeh, K. L.; *Chem. Eng.* 1993, 112.
21. Gundarova R.A.; Khoroshilova-Maslova, I.P.; Bordiugova, G.G.; Ilatovskaia, L.V.; Lapina, I.M. Experimental validation of using ozonized physiological solutions in intraocular infection. *Vestn Oftalmol.* 1996;112(5):9-11.
22. Iuzhakov, A.M; Bykov, V.P.; Ziurniaeva, I.D.; Gogodze, M.G. New prospects in the treatment of intraocular infection. *Vestn Oftalmol.* 2000;116(2):20-2.
23. Bocci V. Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for therapy of human immunodeficiency virus infection and several other diseases. *Med Hypotheses.* 1996; 46(2):150-4.
24. Velano, H.E.; Nascimento, L.C.; Barros, L.M.; Panzeri, H. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Ataphylococcus aureus*. *Pesqui Odontol Brás*, v.15, n. 1, p. 18-22, janeiro/março 2001.
25. Gurley, B. Ozone: pharmaceutical sterilant of the future? *Journal of Parenteral Science and Technology*, v. 39, p. 256-261, 1985.
26. Colombo, A.L.; Guimarães, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; Out 2003, vol.36, n.5: p.599-607.
27. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie E. *Candida*. In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA (eds) *Medical Mycology*. 1ª Edição, Churchill Livingstone, Filadélfia, 2003: p. 195-239.
28. Daniel CRI, Gupta AK, Daniel MP, et al. *Candida* infection of the nail: role of *Candida* as a primary or secondary pathogen. *Dermatology.* 1998; 37: p. 904-907.
29. Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, Edwards JR, Tolson J, Henderson T, Martone WJ. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *American Journal of Medicine* 91:86S-89S, 1991.

30. Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, Li A, Sullivan DJ. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Medical Mycology* 36 (suppl 1): 156-165, 1998.
31. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infectious Diseases* 2, 2002: p. 73-85.
32. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, et al. Practice Guidelines for the treatment of candidiasis. *J Infect Dis.* 2000; 30: p. 662-678.
33. Sant' Ana PL, Milan EP, Martinez R, et al. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from Aids patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97: p. 253-257.
34. Dorko E, Jautová J. *Candida* species isolated in skin infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2002; 16: p. 234.
35. Debusk CH, Daoud R, Thirumoorathi MC, Wilson FM, Khatib R. Candidemia: current epidemiologic characteristics and a long-term follow-up of the survivors. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 26, 1994: p. 697-703.
36. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial bloodstream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 31, 1998: p. 327-332.
37. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clinical Infectious Diseases* 20, 1995: p. 115-125.
38. Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini MI, Richtmann R, Derossi A, Wey S. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 34, 1999: p. 281-286.
39. Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Da Matta DA, Colombo AL. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 2003: p. 401-405.
40. Goldani LZ, Mario PS. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. *Journal of Infection* 46, 2003: p. 150-160.
41. Costa SF, Marinho I, Araújo EA, Manrique AE, Medeiros EAS, Levin AS. Nosocomial fungemia: a 2-year prospective study. *Journal of Hospital Infection* 45, 2000: p. 69-72.