



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

Rogério Rodrigo Ramos

**TERAPIA FOTODINÂMICA: ESTUDO
COMPARATIVO DE LUZ LED E LASER SOBRE
*PROPIONIBACTERIUM ACNES IN VITRO***

**São José do Rio Preto
2018**

Rogério Rodrigo Ramos

**TERAPIA FOTODINÂMICA: ESTUDO
COMPARATIVO DE LUZ LED E LASER SOBRE
*PROPIONIBACTERIUM ACNES IN VITRO***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. José Maria P. de Godoy

**São José do Rio Preto
2018**

Ramos, Rogério Rodrigo

Terapia fotodinâmica: Estudo comparativo de Luz LED e Laser sobre *Propionibacterium acnes in vitro* / Rogério Rodrigo Ramos

São José do Rio Preto, 2018.

47p

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. José Maria Pereira de Godoy

1. Fototerapia. 2. *Propionibacterium acnes*. 3. Oxigênio singlete. 4. Fármacos fotossensibilizantes. 5. Morte celular.

Rogério Rodrigo Ramos

**TERAPIA FOTODINÂMICA: ESTUDO
COMPARATIVO DE LUZ LED E LASER SOBRE
*PROPIONIBACTERIUM ACNES IN VITRO***

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. José Maria Pereira de Godoy

2º Examinador: Prof. Dr. Luís Ferreira Monteiro Neto

3º Examinador: Prof. Dr. André Luciano Baitello

4º Examinador: Profa. Dra. Luciana Ventura Cardoso

5º Examinador: Prof. Dr. Fernando Nestor Facio Junior

Suplentes: Prof. Dr. Nagib Pezati Boer

Prof. Dr. Pedro Francisco Ferraz

São José do Rio Preto, ____/____/____

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| DEDICATÓRIA | i |
| AGRADECIMENTOS | ii |
| EPÍGRAFE | iv |
| LISTA DE FIGURAS | v |
| LISTA DE TABELAS E QUADROS | vi |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | vii |
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | x |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. OBJETIVO | 5 |
| 1.1.1. OBJETIVO GERAL | 5 |
| 2. MATERIAL E MÉTODO | 6 |
| 3. RESULTADOS | 10 |
| 4. DISCUSSÃO | 17 |
| 5. CONCLUSÃO | 24 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 26 |
| 7. ANEXOS | 31 |

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, por ter me dado forças pelas provas que tenho passado, pois elas me ensinaram que as trevas, a escuridão nunca reinarão; e sim, os raios de luzes (caridade, amor, esperança e a fé) que vem do Criador, habitará e reinará sempre em meu coração e na minha alma, pois esses raios me fizeram acreditar que tudo seria possível para alcançar os meus sonhos.*

*Esta dedicatória estende-se ao meu amigo, professor e orientador **Dr. José Maria Pereira de Godoy**. A este devo a confiança em minha capacidade como pesquisador além da paciência e tranquilidade para me transmitir os ensinamentos do tratamento de Terapia Fotodinâmica em *Propionibacterium acnes*. Eternamente grato, pois foi como um pai no período de estudo.*

*Ao **Prof. Dr. Fernando Batigália**, o mestre que Deus colocou no meu caminho, pois com ele muito aprendi.*

*A minha esposa, **Ana Paula Domingos Ramos**, pelo apoio, paciência, amor incondicional, e por não ter medido esforços para que eu alcançasse meus objetivos.*

*A minha mamãe, **Aparecida Terezani Ramos**, pois não foi artrose, artrite, escoliose, osteófitos, estenose entre L5 e S1, tendinite e etc., que lhe impediu de fazer salgadinhos para que pudesse vender e pagar as mensalidades da faculdade de graduação e alcançar o sonho de título de Doutor.*

AGRADECIMENTOS

*Agradeço a **Deus**, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente, e por sempre estar presente em minha vida material e principalmente espiritual.*

*Ao **Prof. Dr. José Maria Pereira de Godoy** por todo suporte para a realização desse trabalho e todas as discussões científicas, pelos ensinamentos com o tratamento *Terapia Fotodinâmica em Propionibacterium acnes*. As suas interpretações objetivas me fizeram desenvolver um raciocínio mais lógico das questões do dia a dia, e contribuindo para meu desenvolvimento profissional. Obrigado por acreditar em mim, sem palavras para expressar minha gratidão em todo nosso tempo de pesquisa.*

*Ao **Prof. Dr. Fernando Batigália**, pelo apoio e incentivo em tantos momentos, pela ajuda e conhecimento compartilhado, todos essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.*

*Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de Doutorado concedida.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (**FAMERP**) por possibilitar a realização desse trabalho.*

Aos meus amigos Luis, José e Fabiana, secretários da Pós-Graduação, pois atuaram como verdadeiros profissionais, na humildade, com paciência e sempre nos lembrado dos nossos deveres, eternamente grato.

*Aos meus **familiares** e demais **amigos**, pelo apoio e incentivo, que de uma ou de outra maneira deram suporte para a realização desse trabalho.*

Aos companheiros acadêmicos, Dra. Brígida Prudêncio, Dr. Nagib Bôer, Dr. Conrado de Lucia, Dr. José Paulo Gomes e Dr. Jean Taliari em agradecimento de nossa amizade.

Aos colegas de curso, porque também souberam o quanto foi difícil conquistar essa vitória.

EPÍGRAFE

“O conhecimento serve para encantar as pessoas, não para humilhá-las”

(Mario Sergio Cortella)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Análise dos diferentes tempos experimentais dentro de um mesmo grupo. Houve diferença estatisticamente significativa entre o número total de colônias e os tempos experimentais representados pela legenda (*), $p < 0,05$ 12*
- Figura 2.** *Relação entre o número total de colônias e os diferentes tempos amostrais para cada grupo. Na comparação dos grupos entre si para cada tempo experimental, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos representados pelas legendas (a), (b), (c), (d) e (e), $p < 0,05$ 13*
- Figura 3.** *Análise dos diferentes tempos experimentais dentro de um mesmo grupo. Houve diferença estatisticamente significativa entre o número total de colônias e os tempos experimentais, representados pelas legendas (* e **), $p < 0,05$ 15*
- Figura 4.** *Relação entre o número total de colônias e os diferentes tempos amostrais para cada grupo. Na comparação dos grupos entre si para cada tempo experimental, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos representados pelas legendas (a), (b) e (c), $p < 0,05$ 16*

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. *Comparação da média \pm desvio padrão do número de colônias obtidas após os diferentes tempos experimentais. As legendas (a) e (b) representam a diferença entre os tempos experimentais dentro de um mesmo grupo..... 11*

Tabela 2. *Comparação da média \pm desvio-padrão do número de colônias obtidas após os diferentes tempos experimentais. As legendas (a) e (b) representam a diferença entre os tempos experimentais dentro de um mesmo grupo..... 14*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|----------------------|--|
| 1mg/mL^{-1} | 1 miligrama por 1 mililitro |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| AM | Azul de metileno |
| DMSO | Dimetilsufóxido |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| Fs | Fotossensibilizador |
| J/cm^2 | Joule/centímetro quadrado |
| LED | Diodo emissor de luz |
| MO | Micro-organismo |
| mW | Miliwatts |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| nm | Nanômetro |
| TFD | Terapia fotodinâmica |
| rpm | Rotação por minuto |
| TSA | Triptecaseína de soja |
| TSB | Triptecaseína de soja (caldo) |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| μM | Micrômetro |
| μs | Microsssegundos |
| Fs* | Estado singlete excitado |
| $^1\text{Fs}^*$ | Primeiro estado excitado singlete |
| $^3\text{Fs}^*$ | Primeiro estado triplete |
| O_2 | Oxigênio |
| $^1\text{O}_2$ | Oxigênio singleto |
| $^3\text{O}_2$ | Oxigênio triplete |
| λ | Comprimento de onda |

RESUMO

Introdução: A *Propionibacterium acnes* é uma bactéria causadora da acne. A terapia fotodinâmica é um tratamento alternativo para a acne, devido aos efeitos colaterais ou à ausência de resposta ao tratamento a drogas orais ou tópicos. A terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica consolidada que tem sua atividade na fotooxidação de matéria biológica, decorrente da atividade de espécies reativas de oxigênio. **Objetivo:** Avaliar a ação de dois tipos de luz vermelho 660nm (Laser e LED) com o fotossensibilizador azul de metileno sobre *Propionibacterium acnes in vitro*. **Método:** O delineamento experimental foi distribuído em quatro grupos (1- controle sem aplicação de luz e sem fotossensibilizador, 2- aplicação de luz, 3- azul de metileno sem luz, e 4- azul de metileno com luz). Os ensaios foram submetidos à irradiação com dois tipos de luz (Laser - Light amplification by stimulated emission of radiation e LED - Light Emitting Diode) vermelho 660nm por quatro ciclos de cinco minutos, com intervalos de três minutos. **Resultados:** No resultado do Laser, foi evidenciado o destaque do quarto ciclo (20 minutos) dos grupos 2, 3 e 4. Apesar dos resultados favoráveis, o tempo de irradiação do *Laser* associado ao fotossensibilizador azul de metileno não foi suficiente para inibir totalmente a proliferação da bactéria. Resultados do LED mostraram que, houve redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nas médias do grupo 4, ainda que o grupo 3 não tenha apresentado significância estatística, mas houve redução detectada entre as médias. **Conclusão:** A ação fotodinâmica é eficiente para a destruição do material biológico por irradiação a 660nm atribuída ao processo de fotossensibilização pela presença do fotossensibilizador. Sugere-se a realização de

outros estudos *in vitro* no sentido de viabilizar a aplicação clínica desse fotossensibilizador em terapia fotodinâmica.

Palavras chaves: Fototerapia, *Propionibacterium acnes*, Oxigênio singlete, Fármacos fotossensibilizantes, Morte celular.

ABSTRACT

Introduction: *Propionibacterium acnes* is a bacterium that causes acne. Photodynamic therapy is an alternative treatment for acne due to the side effects or the lack of response to treatment with oral or topical drugs. Photodynamic therapy is a consolidated therapeutic modality that produces its activity in the photooxidation of organic matter, which arises from the activity of reactive oxygen species. **Objective:** To evaluate the action of two types of 660nm red lights (Laser and LED) with the methylene blue photosensitizer on *Propionibacterium acnes in vitro*. **Method:** The experimental design was distributed into four groups (1 - control group without the application of light and without photosensitizer, 2 - application of light, 3 - Methylene Blue without light, and 4 - Methylene Blue with light). Tests were subjected to red (Laser - Light amplification by stimulated emission of radiation and LED - Light Emitting Diode) irradiation 660 nm by 4 cycles of 5 minutes at 3-minute intervals. **Results:** It was evidenced the prominence of the fourth cycle (20 minutes) of groups 2, 3 and 4 according to the Laser result. Despite the favorable results, the Laser irradiation time photosensitizer associated with Methylene Blue was not sufficient to inhibit bacteria's proliferation completely. LED results showed that, there was a statistically significant reduction ($p < 0.05$) in the means of group 4, although group 3 did not present statistical significance, but there was a reduction detected between the means. **Conclusion:** The photodynamic action is effective for the destruction of the biological material by irradiation at 660nm attributed to the process of photosensitization by the presence of the photosensitizer. Further studies *in vitro* are recommended to enable the clinical application of this photosensitizer in photodynamic therapy.

Key words: Phototherapy, *Propionibacterium acnes*, Singlet oxygen, Photosensitizing drugs, Cell death.

1. INTRODUÇÃO

A acne é uma inflamação da unidade pilossebácea, caracterizada por lesões leves, do tipo comedogênicas, até lesões graves, podendo causar cicatrizes grandes e inestéticas.⁽¹⁾ Um dos micro-organismos (MO) envolvidos na resposta inflamatória da acne é a *Propionibacterium acnes*, uma bactéria Gram-positiva, que altera a composição lipídica produzida pela glândula sebácea, acarretando um meio inflamatório.^(2,3)

Clinicamente, a acne tem aparência de comedões abertos ou fechados, aparecendo esses sinais em processos de cicatrização. Já em processos inflamatórios, os sinais da acne podem aparecer como pápulas, pústulas e até nódulos pequenos e grandes.⁽⁴⁾

Atualmente, o tratamento da acne dispõe do uso de drogas orais ou tópicas, isoladas ou usadas de forma associada. Mas, ainda há casos em que essas opções não podem ser usadas, seja por seus efeitos colaterais ou pela falta de resposta ao tratamento observada com a crescente resistência bacteriana aos antibióticos.⁽⁵⁾

Na tentativa de buscar novas opções terapêuticas, a terapia fotodinâmica (TFD) tem sido considerada um tratamento promissor para a acne, além de ser considerado um método rápido e eficaz.⁽⁶⁾

A TFD é uma modalidade terapêutica consolidada que tem sua atividade na fotooxidação de matéria biológica, a qual é decorrente da atividade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxigênio singleto (1O_2). Tais EROs e 1O_2 ocasionam a morte celular por luz visível na presença de um fotossensibilizador (Fs) e de oxigênio molecular (O_2).⁽⁷⁾

No processo fotodinâmico, o Fs, que está em estado fundamental, é ativado pela luz, absorvendo energia radiante, passando para o estado singlete excitado (Fs*). Após a excitação, o Fs é conduzido ao estado triplete ($^3Fs^*$), estado esse com

maior tempo de vida em relação ao Fs^* . No $^3Fs^*$, o Fs apresenta tempo de vida na escala de microssegundos (μs), tempo suficiente para gerar EROs. Essas espécies podem ser geradas por absorção de elétrons ou hidrogênios, conduzindo a formação de radicais livres, que induzem a morte celular pelo mecanismo tipo I. Ainda por desativação do $^3Fs^*$ por transferência de energia para o O_2 , levando a formação de 1O_2 , mecanismo tipo II que também leva a célula à morte. Tanto “EROs” como o “oxigênio singlete” são mecanismos que podem levar a matéria biológica à morte.⁽⁷⁻⁸⁾

Os mecanismos da TFD envolvidos no tratamento da acne incluem a fotodestruição de *Propionibacterium acnes*, assim como a redução do tamanho das glândulas sebáceas e também a diminuição de gordura no folículo pilossebáceo.⁽⁹⁾

Sendo assim, o processo fotodinâmico é inicializado por absorção de energia radiante. Esta irradiação deve ocorrer em comprimento de onda (λ) adequado, ou seja, o Fs deve ser irradiado em região espectral onde este apresente bandas de absorção. Ao absorver um fóton, o Fs atinge o estado excitado e subsequentemente ocorre a cadeia de processo dinâmico. Neste processo podem ser utilizadas como irradiação distintas fontes de luz, tais como a luz branca da irradiação solar (luz natural) ou, preferencialmente, uma fonte de irradiação artificial que emita na região visível tais como: Light Emitting Diode (LED) ou Light amplification by stimulated emission of radiation (Laser). No entanto, o processo fotodinâmico será proporcional ao número de fótons absorvidos pelo fotossensibilizador no devido λ , e consequentemente proporcional à densidade de energia da fonte no λ de absorção do respectivo fotossensibilizador.⁽¹⁰⁻¹²⁾

O Fs e o λ da fonte de irradiação constituem pares indissociáveis no processo terapêutico, no entanto, a seleção deste par também está relacionada com a profundidade do tecido a ser tratado.⁽¹³⁾ No tratamento por terapia fotodinâmica está

excluída a irradiação no ultravioleta, por causar danos ao tecido, e no infravermelho, por atingir ondas de calor. A terapia fica restrita a região do visível e infravermelho próximo até 800nm.⁽¹¹⁾ Para tratamentos a serem realizados em regiões de maior profundidade no tecido é necessário irradiar no infravermelho próximo, onde a luz atinge maior penetração no tecido biológico. Já tratamentos a serem realizados na derme ou epiderme não demandam comprimentos de onda de maiores penetração no tecido, neste caso, a utilização da luz azul e violeta favorecem a terapia por não agredirem tecidos de maiores profundidades.^(11,14)

Atualmente existem vários Fs desenvolvidos para TFD, mas pouco estudo sobre estrutura e atividade fotodinâmica, o que torna o estudo da estrutura e atividade de grande relevância no que se refere da fotobiológica. Assim, o futuro da terapia é altamente dependente do desenvolvimento de fotossensibilizadores eficientes.⁽¹⁵⁾

O azul de metileno (AM) é um agente fotossensibilizador, que está dentro do ramo da TFD.⁽¹⁶⁾ Na TFD, o AM apresenta bons efeitos sobre infecções provocadas por bactérias, vírus e fungos, com ausência de efeitos colaterais.⁽¹⁷⁾ Estudos têm demonstrado que danos no DNA da célula⁽¹⁸⁾ são causados pela fotoativação do fotossensibilizador AM por luz vermelha, consequente, morte celular.⁽¹⁹⁻²¹⁾

O Fs AM pode ser excitado por luz mono e policromática, onde este apresenta bandas de absorção em região entre 500 a 700nm e mostra boa eficiência fotodinâmica.⁽²²⁻²⁴⁾

Uma base para o estudo deste fotossensibilizador pode ser tomada por proporcionar melhor permeabilidade e incorporação tanto em células como em tecidos.

1.1. Objetivo.

1.1.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação fotodinâmica do Laser e LED vermelho 660nm sobre *Propionibacterium acnes in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODO

Desenho do estudo

Foi avaliado, em laboratório de análises clínicas, cepa de *Propionibacterium acnes* em estudo *in vitro* com delineamento inteiramente casualizado. O tratamento do *Propionibacterium acnes* com cinco minutos por quatro ciclos com intervalo de três minutos utilizando método de irradiação com Laser e LED vermelho 660nm, avaliado pelo contador de colônias mecânico, na clínica da FEF 2014.

Material Biológico

Foi utilizada a cepa padrão (6919) de *Propionibacterium acnes*, a qual foi cultivada por 24 horas em meio líquido Tripticaseína de Soja (TSB, OXOID®), utilizando-se incubação a 35°C.

Fotossensibilizador

Foi ensaiado o fotossensibilizador azul de metileno (AM) 1%, dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 1mg/mL⁻¹, sendo, posteriormente, diluído em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,5% para a obtenção de solução do fotossensibilizador na concentração de 20µM.

Fonte de luz

Foi utilizado o aparelho de Laser Vermelho da marca LASERLine 110V, com comprimento de onda de 660nm, com densidade de energia 192 J/cm², e LED vermelho 110V, com comprimento de onda 660nm, com densidade de energia de 102 J/cm², ambos com feixe de luz contínuo.

Ensaio *in vitro*

O *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 foi cultivado por 24 horas em meio Tripticaseína Soja Líquido, (TSB, OXOID®). Inicialmente realizou a centrifugação (3000 rpm) por um minuto, em seguida o sobrenadante foi desprezado, e o material precipitado, ressuspendido em solução estéril de NaCl (0,5%) e novamente submetido à centrifugação. Esse procedimento foi repetido cinco vezes para a lavagem das células bacterianas e a retirada de componentes do meio de cultura. O material precipitado obtido foi ressuspendido em 0,5mL de solução estéril de NaCl (0,5%) e agitado em Vortex por um minuto, em seguida, foram adicionados 4,5mL de solução de NaCl, e agitado por um minuto. Esta solução foi ajustada ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland, que corresponde, aproximadamente, a $1,5 \times 10^8$ unidade formadora de colônia (UFC) mL⁻¹. A partir dessa solução, foram realizadas diluições seriadas resultando uma concentração de $1,5 \times 10^5$ UFC mL⁻¹.

Atividade antibacteriana

A ação fotodinâmica foi realizada utilizando-se o tipo de estudo delineamento experimental inteiramente casualizado, constituído por quatro grupos (G1, G2, G3 e G4): G1 - bactéria sem aplicação de luz e sem fotossensibilizador (grupo controle); G2 - aplicação de luz sobre a bactéria; G3 - bactéria com AM sem irradiação de luz; e G4 - bactéria com AM com irradiação de luz. O experimento foi conduzido em condições *in vitro*, nos meses de novembro e dezembro de 2014. Foram depositados em tubos de ensaio 1,05mL da suspensão bacteriana e 0,05mL de solução do fotossensibilizador. Os ensaios foram mantidos sob abrigo da luz e 35°C por 15 minutos para o tempo de pré-irradiação e, posteriormente, submetidos à irradiação por quatro ciclos de cinco minutos com intervalos de três minutos. As

amostras foram irradiadas com Laser e LED vermelho com comprimento de onda de 660nm. A cada ciclo, foi removida uma alíquota de 0,05mL e transferida para a placa de Petri contendo meio Ágar Tripticaseína de Soja (TSA). Foi uniformemente distribuída, com o auxílio de alça de Drigalski, e as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Decorrido esse período, foi efetuada a contagem de UFC para a avaliação da atividade fotodinâmica sobre *Propionibacterium acnes*. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Análise estatística

As 48 amostras colhidas foram analisadas quanto à distribuição mediante testes Shapiro-Wilk e D'Agostino & Pearson, mostrando distribuição próxima da normalidade. O tratamento estatístico para comparação dos diferentes tempos terapêuticos dentro de um mesmo grupo se deu mediante teste não paramétrico one-way ANOVA com pós teste de Tukey, adotando intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Cada grupo foi analisado isoladamente. Para a análise comparativa entre os grupos, foi utilizado teste two-way ANOVA para medidas não repetidas e pós teste de Bonferroni para comparação de grupos. O intervalo de confiança adotado foi de 95% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas em Software GraphPad Prism 5.0.

3. RESULTADOS

A Tabela 1 demonstra a comparação das médias do número de colônias obtidas após incubação das amostras em relação aos diferentes grupos e aos diferentes tempos experimentais. A média está relacionada ao desvio padrão, demonstrando o desvio provável de cada grupo em relação às amostras testadas.

Tabela 1. Comparação da média \pm desvio padrão do número de colônias obtidas após os diferentes tempos experimentais. As legendas (a) e (b) representam a diferença entre os tempos experimentais dentro de um mesmo grupo.

| | 5 MIN | 10 MIN | 15 MIN | 20 MIN | P |
|-----------|-----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------|
| G1 | 46,00 \pm 2,64(a,b) | 67,00 \pm 16,82(a) | 54,50 \pm 16,26 | 67,33 \pm 11,59(b) | 0,020 |
| G2 | 16,00 \pm 8,48 | 32,00 \pm 9,16 | 28,00 \pm 4,36 | 30,00 \pm 12,77 | 0 |
| G3 | 23,00 \pm 7,55 | 29,00 \pm 2,82 | 23,00 \pm 2,64 | 20,50 \pm 12,02 | 0,656 |
| G4 | 11,50 \pm 0,70 | 12,50 \pm 4,95 | 18,33 \pm 2,08(a) | 8,66 \pm 3,78(a) | 0,050 |

G: Grupo; Min: Minutos; G1 - sem aplicação de luz e sem fotossensibilizador (grupo controle), G2 - aplicação de luz sobre a bactéria, G3- fotossensibilizador sem irradiação de luz; e G4 - fotossensibilizador com luz.

A Figura 1 representa o número de colônias obtido para cada um dos quatro grupos relacionando os tempos de tratamento dentro de um mesmo grupo. No Grupo 1, houve diferença significativa apenas entre os tempos de 5 e 10 minutos e entre os tempos de 5 e 20 minutos. No Grupo 4, houve diferença entre o tempo de 15 minutos e o tempo de 20 minutos. Não houve diferença entre os tempos de exposição nos Grupos 2 e 3.

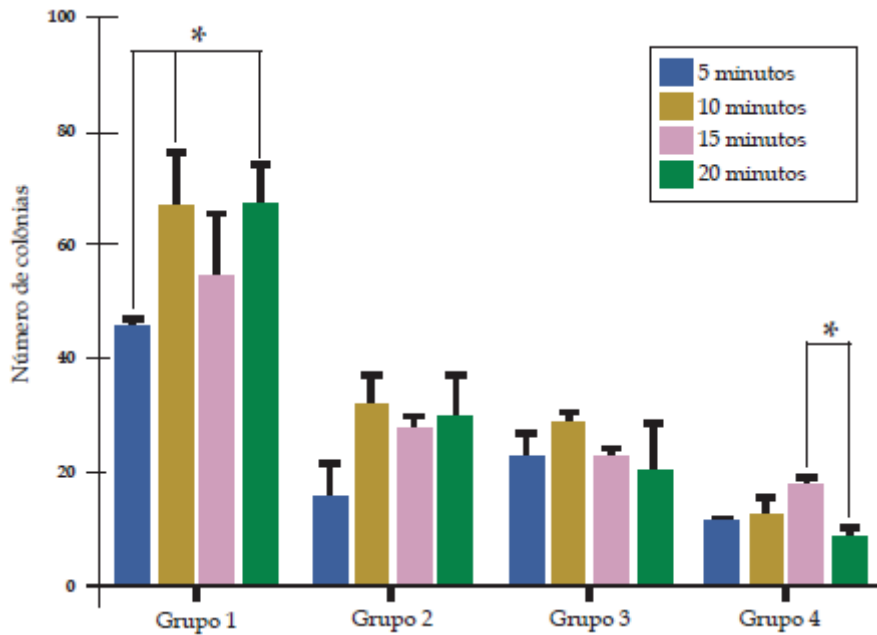


Figura 1. Análise dos diferentes tempos experimentais dentro de um mesmo grupo. Houve diferença estatisticamente significativa entre o número total de colônias e os tempos experimentais representados pela legenda (*), $p < 0,05$.

A Figura 2 representa a comparação entre os diferentes tempos experimentais e os resultados obtidos no número de colônias de cada um dos quatro grupos. No tratamento de cinco minutos, houve diferença significativa entre o Grupo 1 e os Grupos 2(a), 3(b) e 4(c). No tratamento de dez minutos, houve diferença entre o Grupo 1 e os Grupos 2(a), 3(b) e 4(c), e também houve diferença entre o Grupo 2 e o Grupo 4(d) e entre o Grupo 3 e o Grupo 4(e). No tempo de 15 minutos, houve diferença entre o Grupo 1 e os Grupos 2(a), 3(b) e 4(c), e diferença entre o Grupo 2 e o Grupo 4(d). E, no tempo de 20 minutos, houve diferença entre o Grupo 1 e os Grupos 2(a), 3(b) e 4(c) e entre o Grupo 2 e o Grupo 4(d).

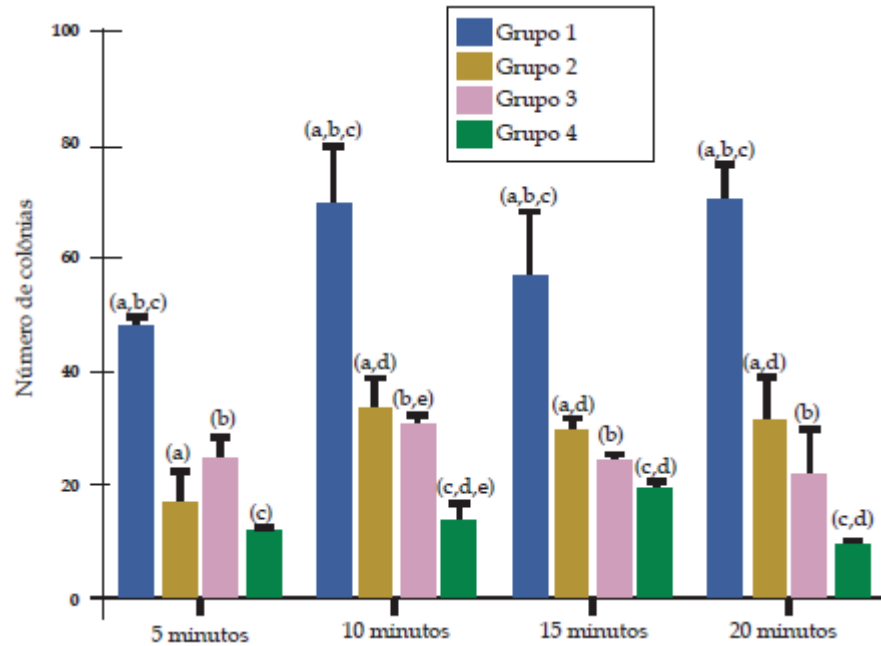


Figura 2. Relação entre o número total de colônias e os diferentes tempos amostrais para cada grupo. Na comparação dos grupos entre si para cada tempo experimental, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos representados pelas legendas (a), (b), (c), (d) e (e), $p < 0,05$.

A Tabela 2 demonstra a comparação das médias, obtidas das análises em triplicata das amostras, em relação aos diferentes grupos e aos diferentes tempos. A média está relacionada ao desvio-padrão, demonstrando o desvio provável de cada grupo em relação às amostras testadas. As legendas (a) e (b) representam os tempos dentro de um mesmo grupo que apresentaram diferença significativa entre si.

Tabela 2. Comparação da média \pm desvio-padrão do número de colônias obtidas após os diferentes tempos experimentais. As legendas (a) e (b) representam a diferença entre os tempos experimentais dentro de um mesmo grupo.

| | 5 MIN | 10 MIN | 15 MIN | 20 MIN | P |
|-----------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------|
| G1 | 42,67 \pm 4,51(a) | 63,67 \pm 22,50 | 53,00 \pm 18,38 | 67,33 \pm 11,59(a) | 0,028 |
| G2 | 68,00 \pm 19,67(a) | 92,67 \pm 5,51(a) | 66,50 \pm 7,78 | 76,00 \pm 1,41 | 0,014 |
| G3 | 35,33 \pm 1,53 | 44,00 \pm 5,66 | 39,50 \pm 12,02 | 43,00 \pm 6,56 | 0,480 |
| G4 | 21,67 \pm 1,53(a) | 16,50 \pm 3,54(b) | 7,50 \pm 2,12(a,b) | 9,00 \pm 2,83(a) | 0,004 |

G: Grupo; Min: Minutos; G1 - sem aplicação de luz e sem fotossensibilizador (grupo controle), G2 - aplicação de luz sobre a bactéria, G3- fotossensibilizador sem irradiação de luz; e G4 - fotossensibilizador com luz.

A Figura 3 representa o número de colônias obtido para cada um dos quatro grupos, relacionando os tempos de tratamento dentro de um mesmo grupo. No Grupo 1, houve diferença significativa apenas entre os tempos de 5 e 20 minutos. No Grupo 2, a diferença se deu entre os tempos de 5 e 10 minutos. No Grupo 3, não houve diferença entre os diferentes tempos de tratamento. E, no Grupo 4, houve diferença entre o tempo de 5 minutos e os tempos de 15 e 20 minutos, bem como houve diferença entre o tempo de 10 minutos e o tempo de 15 minutos.

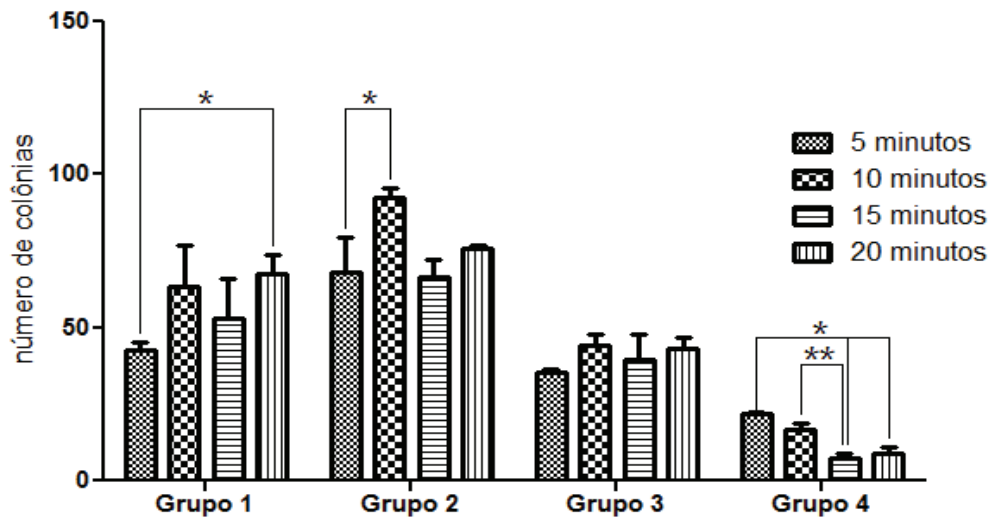


Figura 3. Análise dos diferentes tempos experimentais dentro de um mesmo grupo. Houve diferença estatisticamente significativa entre o número total de colônias e os tempos experimentais, representados pelas legendas (* e **), $p < 0,05$.

A Figura 4 representa a comparação entre os diferentes tempos de tratamento e os resultados obtidos no número de colônias de cada um dos quatro grupos. No tratamento de 5 minutos, houve diferença significativa entre os grupos 1 e 2 (a), entre os Grupos 2 e 3 (b), e entre 2 e 4 (c). No tratamento de 10 minutos, houve diferença entre o grupo 1 e os Grupos 2 e 4 (a), entre o grupo 2 e os Grupos 3 e 4 (b), e entre os Grupos 3 e 4 (c). No tempo de 15 minutos a diferença se deu entre os Grupos 1 e 4 (a), entre o Grupo 2 e os Grupos 3 e 4 (b), e entre os Grupos 3 e 4 (c). No tempo de 20 minutos houve diferença entre o Grupo 1 e os Grupos 3 e 4 (a), entre o Grupo 2 e os Grupos 3 e 4 (b) e entre os Grupos 3 e 4 isoladamente (c).

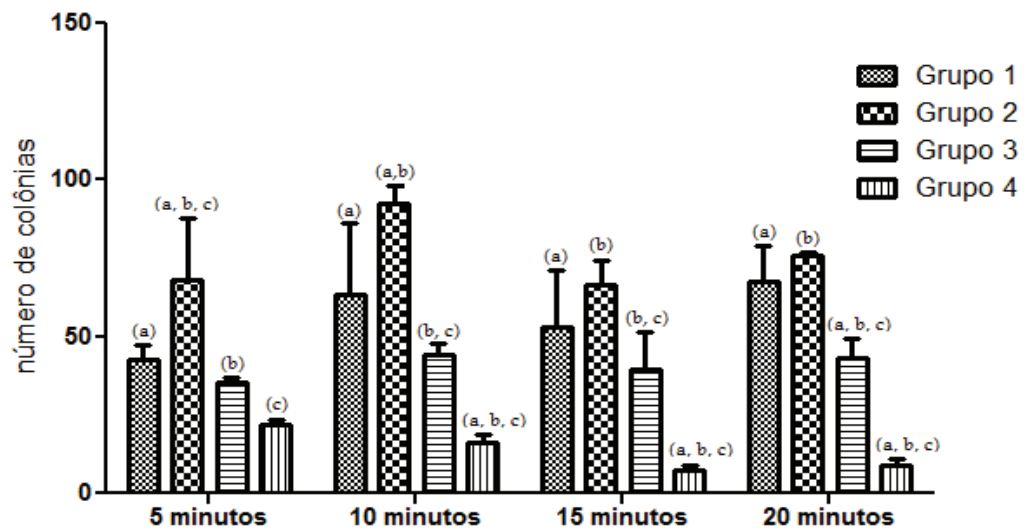


Figura 4. Relação entre o número total de colônias e os diferentes tempos amostrais para cada grupo. Na comparação dos grupos entre si para cada tempo experimental, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos representados pelas legendas (a), (b) e (c), $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

De acordo com a análise dos dados obtidos, o Grupo 1 (controle) mostrou uma tendência ao crescimento dos micro-organismos nos tempos de 10, 15 e 20 minutos, em que os valores do número de colônias se manteve próximo e equilibrado. Isso reflete o crescimento natural das colônias sem qualquer intervenção externa. Ao analisar o Figura 2, pode-se perceber que o Grupo 1 se mostrou significativamente maior em comparação aos Grupos 2, 3 e 4, em todos os tempos amostrais.

Os Grupos 2 e 3 comportaram-se de maneira semelhante, mostrando uma redução inicial no número de colônias do micro-organismo. Porém, essa redução não se estendeu após a fototerapia de cinco minutos, havendo um crescimento de colônias em um patamar próximo ao dos cinco minutos em todos os tempos amostrais. Assim, não houve diferença significativa entre os diferentes tempos para ambos os grupos, como verificado no Figura 1. Ao analisarmos os tempos amostrais comparativamente entre os quatro grupos, presentes no Figura 2, pode-se perceber que os Grupos 2 e 3 apresentam contagem de colônias significativamente inferiores às apresentadas no Grupo 1. Pode-se dizer que os Grupos 2 e 3 apresentam uma eficiência semelhante no controle das populações do micro-organismo.

O Grupo 4 apresentou a terapêutica com os melhores valores comparativos, como observado na Figura 2. O número de colônias em todos os tempos amostrais desse grupo se apresentou com valores inferiores aos demais três grupos. A ênfase se deu aos tempos de 10, 15 e 20 minutos, em que o número de colônias foi significativamente menor em relação aos Grupos 1, 2 e 3. Quando analisada a Figura 1, quanto aos diferentes tempos de fototerapia associados à terapêutica proposta ao Grupo 4, nota-se que uma terapia mais prolongada não se mostrou mais eficiente para esse tratamento, havendo diferença apenas entre os tempos de

15 minutos e 20 minutos. Infere-se que, desde os primeiros cinco minutos de terapia, há uma inibição no crescimento das colônias do micro-organismo, perdurando essa inibição pelos próximos 20 minutos e de maneira mais eficiente se comparada aos grupos 1, 2 e 3.

A ação fotodinâmica do fotossensibilizador azul de metileno e Laser vermelho foi estudada na inibição de *Propionibacterium acnes*, na qual foi realizado um estudo comparativo das UFCs. No experimento, o *Propionibacterium acnes* foi inibido pela ação fotodinâmica, apresentando fotossensibilização do azul de metileno quando irradiado com Laser vermelho com comprimento de onda de 660nm, sendo apresentados na Figura 1.

Como é notório, os grupos ensaiados utilizaram elementos como o fotossensibilizador azul de metileno e luz vermelha sobre a bactéria, elementos importantes para a ação da TFD. Deve ser ressaltado que esses elementos da TFD entram em ação, levando a bactéria ao estresse oxidativo, devido à formação de oxigênio singlete e espécies reativas de oxigênio, e assim à morte celular.^(7,8)

Os resultados demonstraram que a aplicação do Laser vermelho inibe o crescimento das UFCs da bactéria. Esses resultados corroboram os achados de Ogata e Fernandes (2013), que utilizaram a mesma fototerapia como tratamento de acne *in vitro*, porém, os tempos de tratamento utilizados pelos autores foram diferentes, sendo de 5, 15, 30 e 60 minutos. Os seus resultados foram excelentes, ficando com zero de UFC da bactéria de *Propionibacterium acnes*.⁽²⁵⁾

No ensaio utilizando somente a luz, foi observada redução das UFCs da bactéria. Essa atividade teve uma evolução positiva para os quatro ciclos do G2, evidenciando que a luz atingiu o platô sem atingir a eliminação total das UFCs de *Propionibacterium acnes* (Tabela 1). Para Ashkenazi et al. (2003), essa limitação

pode ser atribuída a uma possível saturação da membrana, pois o efeito da luz sobre *Propionibacterium acnes* é pelo fato da bactéria sintetizar porfirinas, principalmente protoporfirina e coproporfirina, substâncias fotossensíveis que, ao receberem luz, absorvem a energia da luz, e essa energia interfere nas reações químicas e metabólicas celulares, e, quando a luz é absorvida pelas porfirinas, ocorre a formação de EROs, resultando em danos na membrana da bactéria e morte celular.⁽²⁶⁾

No entanto, quando associados à luz com o Fs (Grupo 4 - Tabela 1), há eliminação da bactéria por processo fotoinduzido, visto que esse processo se inicia por transferência de hidrogênios ou elétrons, reações radicalares ou por ataque eletrofílico do oxigênio singlete a membranas, levando à apoptose da matéria biológica.^(27,28) Esse processo comprova que houve a incorporação do azul de metileno sobre *Propionibacterium acnes*, pois o processo fotoinduzido levou à eliminação da bactéria.

A incorporação do azul de metileno sobre *Propionibacterium acnes* leva à otimização do processo fotooxidativo. Dessa forma, sabendo-se que o fotossensibilizador pode encontrar-se tanto sobre as paredes celulares como em organelas, a ação da TFD pode ocorrer de forma generalizada, propagando-se tanto por ataque interno (meio intracelular) como externo (meio extracelular), o que justifica a inativação parcial de *Propionibacterium acnes* (Grupo 3 - Tabela 1).

Portanto, para um estudo mais detalhado sobre incorporação do fotossensibilizador, o estudo indica a necessidade de um trabalho de imagens por microscopia de fluorescência para analisar a incorporação do fotossensibilizador em *Propionibacterium acnes*.

Já o resultado do LED mostra que a atividade fotodinâmica em *Propionibacterium acnes* está relacionada a uma adequada incorporação do fotossensibilizador, a qual pode ser maximizada pela irradiação da luz.

A análise comparativa entre os diferentes tempos de tratamento dentro de um mesmo grupo está representada na Tabela 2 e na Figura 3. Pode-se observar que o tratamento, realizado no Grupo 1, mostrou eficiência apenas no controle dos números de UFCs, visto que, com uma exposição de 5 minutos, apresentou número significativamente menor de colônias que a obtida em 20 minutos. Além disso, após 10 minutos de tratamento, o número de colônias pareceu se estabilizar, chegando aos 20 minutos de exposição sem diferença notória entre os tempos de 10, 15 e 20 minutos. Fato semelhante pode ser observado no tratamento proposto ao Grupo 3, em que não houve diferença entre os tempos de exposição, mas, com relativa diminuição aparente na exposição de 5 minutos. Comparativamente entre os Grupos expostos na Figura 4, o Grupo 1 e o Grupo 3 também não apresentam diferenças significantes em relação à redução do número de colônias, seguindo um padrão de semelhança. Porém, após 20 minutos de tratamento, o Grupo 3 mostrou uma significativa redução em relação ao Grupo 1, sua terapia, poderia ser mais eficiente se o tratamento fosse mais prolongado.

O tratamento proposto ao Grupo 2 mostrou que houve diferença entre a aplicação de 5 minutos e de 10 minutos, em que o número de colônias se mostrou superior. Após 15 minutos, o número de colônias apresentou tendência à diminuição, mas não suficiente para demonstrar diferença significativa em relação ao primeiro tempo, de 5 minutos. Quando analisado em relação aos demais grupos, o Grupo 2 apresentou o maior número total de colônias obtidas em todos os tempos amostrais, sendo equiparado apenas pelo Grupo 1 nos tempos de 15 e 20 minutos

(Figura 4). Pode-se inferir que, entre os tratamentos propostos esse grupo foi o que apresentou menor efeito.

Já o tratamento, realizado no Grupo 4, apresentou diferenças significantes entre os diferentes tempos amostrais, com diminuição acentuada no número de colônias em relação ao mais longo período de exposição à fonte luminosa. Entre os primeiros 5 e 10 minutos essa diferença não foi aparente, porém, revelada quando analisado o tempo de 5 minutos em relação aos de 15 e 20 minutos, mostrando eficiência no tratamento em um intervalo mais longo de tempo. Em relação aos outros três grupos, como observado no Figura 4, o Grupo 4 foi o que mostrou os melhores resultados, uma redução significativa do número de colônias frente às fototerapias de 10, 15 e 20 minutos.

No estudo de König, et al. (2000), foi analisada a atividade da TFD, sem o uso de fotossensibilizadores contra *Propionibacterium acnes*. Em seu trabalho, foi constatada a presença de endoporfirinas (Fs endógenos) na bactéria pelo uso de fluorescência.⁽¹⁴⁾ Mediante ao fato, os autores descreveram que a TFD pode ser utilizado sem o uso de fotossensibilizadores para o tratamento de acne, desde que o comprimento de onda seja compatível com o Fs endógeno.⁽²⁹⁾ Porém, o tratamento utilizando somente a irradiação (Tabela 2 - Grupo 2), resultou em efeito antagônico. Não houve redução ou inibição da bactéria e, sim, a proliferação de *Propionibacterium acnes*. Os resultados mostram que apenas a exposição de *P. acnes* à luz em dose de comprimento de onda 660nm, com intensidade de energia de até 35mW, não teria efeito inibidor sobre a bactéria.

Já o tratamento do fotossensibilizador na ausência de luz (Grupo 3 - Tabela 2) apresentou ação bactericida, pois é observada a redução das UFCs da bactéria. Essa atividade é devido à incorporação do Fs sobre *Propionibacterium acnes*, isso

leva à otimização do processo oxidativo celular. Dessa forma, sabendo-se que o Fs pode encontrar-se tanto nas paredes celulares, como em organelas, o efeito citotóxico pode ocorrer de forma generalizada, propagando-se tanto por ataque interno (meio intracelular) como externo (meio extracelular), o que justifica a redução de *Propionibacterium acnes*. Liu et al. (2012), explica que o fotossensibilizador apresenta caráter catiônico e por isso liga-se em ambientes com cargas opostas,⁽³⁰⁾ dessa maneira, acumula-se preferencialmente, em mitocôndria, pelo fato de o ambiente eletroquímico da matriz mitocondrial ser negativo.⁽³¹⁾ Sendo assim, o Fs catiônico se liga à região polianiônica do DNA e isso leva à degradação oxidativa das bases via oxigênio singleto, o que viabiliza a morte celular.⁽³²⁾

O resultado da ação fotodinâmica (Grupo 4 - Tabela 2) é observado somente após a irradiação 660nm sobre *Propionibacterium acnes*, em que ocorre uma inibição significativa no número de UFCs da bactéria. A eficiência observada pode ser atribuída não somente a fonte de irradiação, mas também ao efeito citotóxico do fotossensibilizador. Dessa forma, quando associados à luz com o Fs, a ação fotodinâmica se inicia por transferência de hidrogênios ou elétrons, reações radicalares ou por ataque eletrofílico do oxigênio singleto, levando à destruição do material biológico.^(27,28) Fator importante do fotossensibilizador azul de metileno, é que a banda de absorção de luz ocorre na região de comprimento de onda entre 620-660nm.⁽³³⁾ Essa característica do Fs garante a penetração da luz no material biológico, quando usado o comprimento de onda próximo a essa região.⁽³⁶⁾ Portanto, o comprimento de onda 660nm da luz LED foi eficiente para a fotoestimulação do Fs, pois o estudo mostra que a ação fotodinâmica da luz sobre *Propionibacterium acnes* está relacionada a uma adequada incorporação do Fs, a qual pode ser notada com a morte celular.

5. CONCLUSÃO

O tratamento com TFD foi eficiente nos dois tipos de experimentos de luz. Na avaliação da ação fotodinâmica do Laser e LED associado com o Fs, houve inativação dos micro-organismos *P. acnes*. Portanto, a TFD foi eficaz no controle das populações de *P. acnes in vitro*.

São sugeridas mais pesquisas *in vitro*, aumentando o tempo de ensaio, sintetização de fotossensibilizadores, utilização de microscopia de fluorescência e confocal para o estudo da ação de TFD para o tratamento de *Propionibacterium acnes*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Matsuchita HLP, Matsuchita ASP. Uso da Própolis na Prevenção e Tratamento da Acne Vulgar. *Uniciências*. 2014;18(1):19-23.
2. Dessinioti C, Katsambas AD. The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2010;28(1):2-7.
3. Liu PF, Nakatsuji T, Zhu W, Gallo RL, Huang CM. Passive immunoprotection targeting a secreted CAMP factor of *Propionibacterium acnes* as a novel immunotherapeutic for acne vulgaris. *Vaccine*. 2011;29(17):3230-8.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria SAS/MS n.º 143, de 31 de março de 2010. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas de Acne Grave. Diário Oficial da União, Brasília, 2010.
5. Paschoal FM, Ismael APPB. A ação da luz no tratamento da acne vulgar. *Surg Cosmet Dermatol*. 2010;2(2):117-23.
6. Issa MC, Manela-Azulay M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. *An Bras Dermatol*. 2010;85(4):501-11.
7. Inada NM, Costa MM, Guimarães OC, Ribeiro Eda S, Kurachi C, Quintana SM, et al. Photodiagnosis and treatment of condyloma acuminatum using 5-aminolevulinic acid and homemade devices. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2012;9(1):60-8.
8. Uchoa AF, Baptista MS. Terapia fotodinâmica: Mecanismos e perspectivas de desenvolvimentos de novos fotossensibilizadores. *J Bras Laser*. 2007;2(4):10-23.
9. Katsambas A, Dessinioti C. New and emerging treatments in dermatology: acne. *Dermatol Ther*. 2008;21(2):86-95.
10. McCaughan JJS. Photodynamic therapy: a review. *Drug Aging*. 1999;15(1):49-68.

11. Bonnett, R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. 1st ed. Amsterdam: Gordon & Breach; 2000.
12. Uchoa FA. *Síntese, Caracterização e Fotoatividade de Fotossensibilizadores Derivados de Protoporfirina IX e de Clorofilina*. [Doutorado]. São Paulo (SP): Univ São Paulo; 2007.
13. Christie JG, Kompella UB. Ophthalmic light sensitive nanocarrier systems. *Drug Disc Today*. 2008;13(3-4):124-134.
14. Ibbotson SH, Moseley H, Brancalion L, Padgett M, O'Dwyer M, Woods JA, *et al*. Photodynamic therapy in dermatology: Dundee clinical and research experience. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2004;1(13):211-223.
15. Savellano MD, Hasan T. Targeting cells that overexpress the epidermal growth factor receptor with polyethylene glycolated BPD verteporfin photosensitizer immunoconjugates. *Photochem Photobiol*. 2003;77(4):431-439.
16. Stocche RM, Garcia LV, Reis MP, Klamt JG, Évora PRB. Uso do Azul de Metileno no Tratamento de Choque Anafilático Durante Anestesia. Relato de Caso. *Rev. Brasil. Anest*. 2004;54(6):809-814.
17. Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, *et al*. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2005;2(3):175-91.
18. Sturmey RG, Wild CP, Hardie LJ. Removal of red light minimizes methylene blue-stimulated DNA damage in oesophageal cells: implications for chromoendoscopy. *Mutagenesis*. 2009;24(3):253-8.
19. Prates RA, Silva EG, Yamada Jr AM, Suzuki LC, Paula CR, Ribeiro MS. The irradiation parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells. *Proc of SPIE*. 2008;6846(1):6846061-6846066.

20. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol.* 1992;25(2):77-81.
21. Wainwright M. Photoinactivation of viruses. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(5):406-11.
22. Budavari S. The Merck Index. An encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 12.th ed. Whitehouse Station: Merck Research Laboratories Division of Merck & Co; 1996.
23. Tardivo JP, Del Giglio A, Paschoal LHC, Ito AS, Baptista, MS. Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2004;1(4);345-346.
24. Nunez SC. Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica. [Doutorado]. São Paulo (SP): Univ São Paulo; 2007.
25. Ogata FRA, Fernandes AU. Os benefícios do laser de baixa potência em acnes: um estudo comparativo. [Resumo]. *Unicastelo:* 2013;1;423-424.
26. Ashkenazi H, Malik Z, Harth Y, Nitzan Y. Eradication of *Propionibacterium acnes* by its endogenic porphyrins after illumination with high intensity light. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;35(1):17-24.
27. Song D, Lindoso JA, Oyafuso LK, Kanashiro EH, Cardoso JL, Uchoa AF, et al. Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(10):711-5.
28. Weber G, Charitat T, Baptista MS, Uchoa AF, Pavani C, Junqueira HC, et al. Lipid oxidation induces structural changes in biomimetic membrane. *Soft Matter.* 2014;10(24):4241-7.

29. König K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. *Cell Mol Biol.* 2000;46(7):1297-1303.
30. Liu T, Li Y, Du Q, Sun J, Jiao Y, Yang G, et al. Adsorption of methylene blue from aqueous solution by graphene. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2012;90(1):197-203.
31. Severino D, Junqueira HC, Gugliotti M, Gabrielli DS, Baptista MS. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. *Photochem Photobiol.* 2003;77(5):459-468.
32. Wainwright M. Methylene blue derivatives--suitable photoantimicrobials for blood product disinfection?. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;16(4):381-394.
33. Wainwright M. Phenothiazinium photosensitisers: V. Photobactericidal activities of chromophore-methylated phenothiazinium salts. *Dyes and Pigments.* 2007;73(1):7-12.

7. ANEXOS
