



# ACTAS Derma-Sifiliográficas

Full English text available at  
[www.actasdermo.org](http://www.actasdermo.org)



## ORIGINAL

# Terapia fotodinámica antimicrobiana *in vitro* aplicada sobre *Trichophyton mentagrophytes* con nuevo azul de metileno como fotosensibilizador



P. López-Chicón, Ò. Gulías, S. Nonell y M. Agut\*

Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, Barcelona, España

Recibido el 18 de mayo de 2016; aceptado el 19 de junio de 2016

Disponible en Internet el 18 de julio de 2016

### PALABRAS CLAVE

Nuevo azul de metileno;  
Terapia fotodinámica antimicrobiana;  
*Trichophyton mentagrophytes*

### Resumen

**Introducción y objetivos:** La terapia fotodinámica antimicrobiana combina el uso de un fármaco fotosensibilizante, la luz y el oxígeno para erradicar microorganismos patógenos. *Trichophyton mentagrophytes* es un hongo dermatofito capaz de invadir la piel y tejidos queratinizados. El objetivo de este trabajo es aplicar la terapia fotodinámica antimicrobiana para la inactivación *in vitro* de *T. mentagrophytes* utilizando el nuevo azul de metileno como agente fotosensibilizador.

**Material y métodos:** Se aplica un diseño factorial completo para optimizar los parámetros que permiten la fotoinactivación del dermatofito. Se tiene en cuenta la concentración del nuevo azul de metileno, el tiempo de contacto entre el fotosensibilizador y el hongo antes del tratamiento con luz y la fluencia de luz roja aplicada entre 620 y 645 nm.

**Resultados:** La mínima concentración de nuevo azul de metileno que produce una mortalidad de todas las células de *T. mentagrophytes* de la suspensión inicial (concentración  $\sim 10^6$  ufc/ml) es  $50 \mu\text{M}$  para una fluencia de  $81 \text{ J/cm}^2$  y un tiempo previo de contacto hongo-fotosensibilizador de 10 min. Si se aumenta la concentración a  $100 \mu\text{M}$  la fluencia que se necesita disminuye a  $9 \text{ J/cm}^2$ .

**Conclusiones:** La comparación de nuestros datos con otros publicados muestra que la susceptibilidad de *T. mentagrophytes* a la terapia fotodinámica antimicrobiana con nuevo azul de metileno es cepa-dependiente. El nuevo azul de metileno es un fotosensibilizador a tener en cuenta para el tratamiento de las micosis cutáneas causadas por este dermatofito.

© 2016 AEDV. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [montserrat.agut@iqs.url.edu](mailto:montserrat.agut@iqs.url.edu) (M. Agut).

**KEYWORDS**

New methylene blue;  
Antimicrobial  
photodynamic  
therapy;  
*Trichophyton  
mentagrophytes*

## In Vitro Antimicrobial Photodynamic Therapy Against *Trichophyton mentagrophytes* Using New Methylene Blue as the Photosensitizer

**Abstract**

**Introduction and objectives:** Antimicrobial photodynamic therapy combines the use of a photosensitizing drug with light and oxygen to eradicate pathogens. *Trichophyton mentagrophytes* is a dermatophytic fungus able to invade the skin and keratinized tissues. We have investigated the use of new methylene blue as the photosensitizing agent for antimicrobial photodynamic therapy to produce the in vitro inactivation of *T. mentagrophytes*.

**Material and methods:** A full factorial design was employed to optimize the parameters for photoinactivation of the dermatophyte. The parameters studied were new methylene blue concentration, contact time between the photosensitizing agent and the fungus prior to light treatment, and the fluence of red light (wavelength, 620–645 nm) applied.

**Results:** The minimum concentration of new methylene blue necessary to induce the death of all *T. mentagrophytes* cells in the initial suspension (approximate concentration,  $10^6$  colony forming units per milliliter) was  $50 \mu\text{M}$  for a fluence of  $81 \text{ J}/\text{cm}^2$  after a contact time of 10 minutes with the photosensitizing-agent. Increasing the concentration to  $100 \mu\text{M}$  allowed the fluence to be decreased to  $9 \text{ J}/\text{cm}^2$ .

**Conclusions:** Comparison of our data with other published data shows that the susceptibility of *T. mentagrophytes* to antimicrobial photodynamic therapy with new methylene blue is strain-dependent. New methylene blue is a photosensitizing agent that should be considered for the treatment of fungal skin infections caused by this dermatophyte.

© 2016 AEDV. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

**Introducción**

La terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDa) utiliza luz visible para eliminar microorganismos patógenos con la ayuda de un fármaco fotoactivable. La interacción de este agente fotosensibilizador (FS) con luz y oxígeno conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) inductoras de la muerte de los agentes infecciosos a erradicar. Al no utilizar una diana celular concreta, es muy difícil que las células generen resistencias al fármaco fotosensibilizante empleado<sup>1</sup>.

La TFDa es especialmente atractiva gracias a su selectividad; esto es consecuencia tanto de poder disponer de FS con una afinidad preferente por las células microbianas respecto al tejido del huésped, como de que el efecto fotodinámico se restringe a la zona tratada con luz<sup>2</sup>.

*Trichophyton mentagrophytes* es un hongo dermatofito capaz de invadir la capa córnea de la epidermis y estructuras queratinizadas, como pelo y uñas, causando micosis cutáneas conocidas comúnmente como tiñas<sup>3,4</sup>. Los tratamientos actuales se basan mayoritariamente en el uso de agentes antifúngicos que, sobre todo cuando deben emplearse por vía oral, pueden ocasionar efectos secundarios indeseables<sup>5</sup>.

El nuevo azul de metileno (NMB) es una fenotiazina plana tricíclica con potencial fototerapéutico, ya que su longitud de onda de absorción se encuentra dentro del margen donde se da la máxima penetración de la luz en el tejido del huésped (entre 600-850 nm)<sup>6,7</sup>. En soluciones acuosas tamponadas el NMB absorbe luz a 630 nm y emite fluorescencia a 650 nm.

El objetivo de este trabajo es la optimización del método para la fotoinactivación *in vitro* de *T. mentagrophytes* utilizando el nuevo azul de metileno como FS.

**Material y métodos****Reactivos químicos**

El FS NMB (*new methylene blue*) y el tampón fosfato ([PBS] Sterile dulbecco's Phosphate Buffered Saline pH 7.4) fueron adquiridos en SIGMA-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, EE. UU.). La estructura del NMB se muestra en la figura 1.

El medio de cultivo fúngico, agar de Sabouraud (SB), fue preparado a partir de Sabouraud Dextrose Agar CM0041 pH  $5,6 \pm 0,2$  (Oxoid Limited, Basingstoke, Reino Unido).

La disolución madre de NMB 1 mM fue preparada en agua tamponada estéril (PBS, pH = 7,4). Las disoluciones de trabajo de NMB se disolvieron a oscuras en PBS hasta la concentración deseada y se almacenaron a 4 °C.

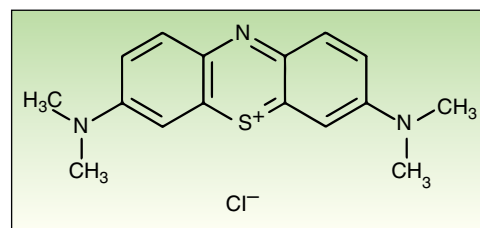


Figura 1 Estructura química del nuevo azul de metileno.

**Tabla 1** Diseño experimental para cada una de las concentraciones de nuevo azul de metileno (0, 0,1, 1, 10, 25, 50, 75, 100 y 1000  $\mu\text{M}$ )

		$t_{\text{irradiación}} / \text{min}$			
		0	10	30	90
$t_{\text{incubación}} / \text{min}$	0	Experiencia 1	Experiencia 2	Experiencia 3	Experiencia 4
	10	Experiencia 5	Experiencia 6	Experiencia 7	Experiencia 8
	30	Experiencia 9	Experiencia 10	Experiencia 11	Experiencia 12
	90	Experiencia 13	Experiencia 14	Experiencia 15	Experiencia 16

### Cepa fúngica, condiciones de cultivo y preparación de las suspensiones celulares

Se ha utilizado la cepa de *T. mentagrophytes* CECT 2956 obtenida de la Colección española de cultivos tipo (Valencia, España).

Los cultivos de *T. mentagrophytes* CECT 2956 se realizan en SB y se incubaron aeróbicamente y en oscuridad a 26 °C durante 14 días. Una vez crecidas las colonias, estas se desprendieron de la superficie del medio de cultivo sólido por agitación manual mediante una solución salina estéril con bolas de cristal de 3 mm de diámetro. La suspensión celular fue filtrada a través de gasa estéril. Las suspensiones de trabajo se ajustaron a un nivel de concentración de aproximadamente  $10^6$  UFC/ml en solución salina estéril.

### Fuente de luz

*T. mentagrophytes* fue irradiado con una lámpara LED Photocare (SORISA, Sant Quirze del Vallès, España). Para excitar el NMB se seleccionó una emisión roja entre 620 y  $645 \pm 10$  nm.

### Diseño de experiencias para optimizar el protocolo de fotoinactivación del dermatofito *T. mentagrophytes*

La optimización del protocolo para la fotoinactivación de células de *T. mentagrophytes* mediante TFDa se realizó aplicando el diseño experimental completo resultado de la combinación de 3 variables aplicadas a diferentes niveles: concentración final de NMB (niveles: 0, 0,1, 1, 10, 25, 50, 75, 100 y 1000  $\mu\text{M}$ ), tiempo de incubación del FS en contacto con el hongo (niveles: 0, 10, 30 y 90 min) y tiempo de irradiación (niveles: 0, 10, 30 y 90 min).

En la [tabla 1](#) se detallan las experiencias realizadas. En resumen, para cada una de las 9 concentraciones de NMB ensayadas se llevaron a cabo 16 experiencias, lo que dio un total de 144 experiencias.

### Experimentos de fotoinactivación de *Trichophyton mentagrophytes*

A cada una de las suspensiones de trabajo, de aproximadamente  $10^6$  UFC/ml, se adicionó una de las concentraciones de NMB, se incubó a oscuras durante 10, 30 o 90 min a 30 °C y

120 r.p.m. Transcurrida la incubación, para excitar la banda de 630 nm del NMB se irradió la muestra, sin lavado previo del FS en exceso, entre 620 y 645 nm mediante la fuente de luz durante 10, 30 o 90 min, correspondiente a una fluencia de 9, 27 y 81  $\text{J cm}^{-2}$ , respectivamente.

Finalizado el tratamiento de luz se sembraron 0,1 ml de la suspensión sobre placas de Petri que contenían SB, se incubó en oscuridad a 26 °C durante 14 días y se realizó el recuento de las colonias formadas después del tratamiento fotodinámico.

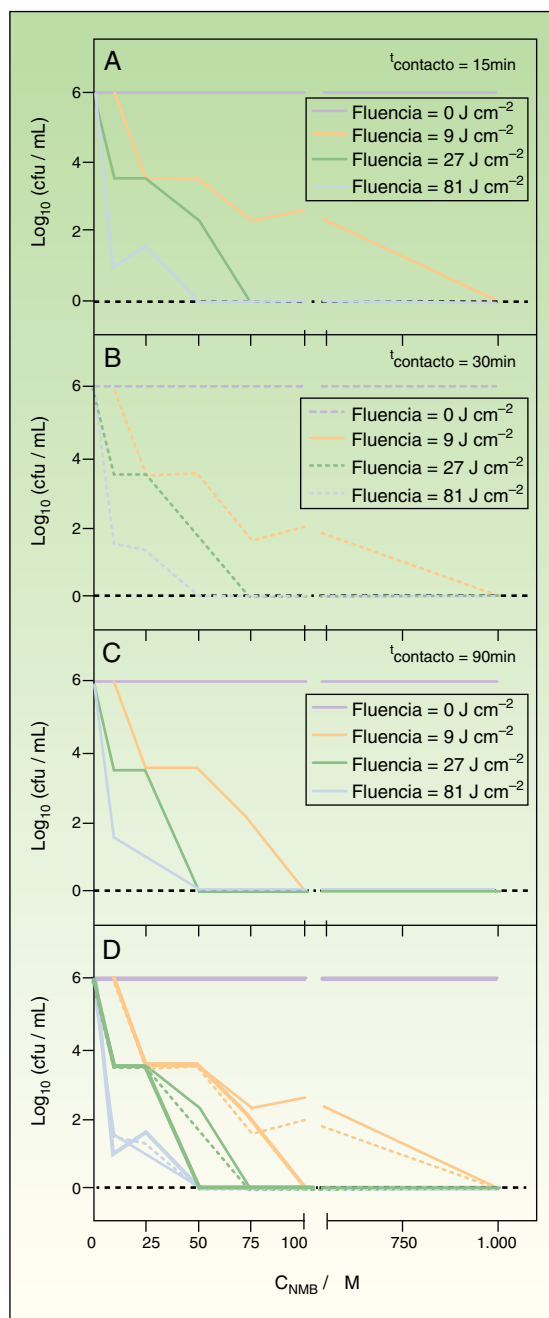
El control de toxicidad de la luz (sin FS) y la toxicidad del FS (sin luz) se realizó para cada ensayo y en las mismas condiciones en que se realizaron los experimentos.

### Resultados

Se ha evaluado la optimización *in vitro* de los factores a emplear en la TFDa con NMB frente a *T. mentagrophytes* (concentración del FS, tiempo de contacto y tiempo de irradiación) mediante la disminución de la viabilidad celular expresado como reducción logarítmica del número UFC/ml a partir de suspensiones celulares iniciales de  $\sim 10^6$  UFC/ml. La exposición del hongo a la luz en ausencia del FS no inhibió su crecimiento en cualquiera de las 3 fluencias de luz empleadas (datos no mostrados). El ensayo de toxicidad a oscuras demuestra que el NMB solo es tóxico para el dermatofito si se combina con luz (función roja de la [fig. 2](#)).

Los resultados expuestos en la [figura 2](#) indican que las concentraciones de 0, 0,1 y 1  $\mu\text{M}$  de NMB no producen efecto fungicida sobre *T. mentagrophytes*, ya que se obtiene un cultivo confluyente después de irradiar la muestra para todos los tiempos de incubación e irradiación ensayados. No obstante, aplicando concentraciones de 10 y 25  $\mu\text{M}$  de NMB ya se detecta un efecto inhibitor del crecimiento que, en algunas condiciones, llega a alcanzar una reducción de hasta 5 unidades logarítmicas en el número UFC/ml, no lográndose en ningún caso la inhibición total del hongo. La erradicación de todas las colonias se pudo conseguir aplicando concentraciones de FS más elevadas: 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$ , combinadas con los tiempos de incubación e irradiación más largos empleados. Por último, si se irradia la muestra con NMB 1000  $\mu\text{M}$  se produce un efecto fungicida total para cualquier combinación de las experiencias ensayadas para esta concentración.

Así que, de los resultados obtenidos al aplicar TFDa sobre suspensiones celulares de *T. mentagrophytes* ( $10^6$  UFC/ml), puede extraerse que con un tiempo de agitación e irradiación de 10 min ( $9 \text{ J/cm}^{-2}$ ) la concentración mínima de



**Figura 2** Reducción logarítmica del número de UFC/ml de *Trichophyton mentagrophytes* después del tratamiento fotodinámico con nuevo azul de metileno (NMB) irradiando la muestra entre 620 y 645 nm.

Panel A: tiempo de contacto de 10 min. Panel B: tiempo de contacto de 30 min. Panel C: tiempo de contacto de 90 min. En todos los paneles: control de la luz (función roja); fluencia de  $9 \text{ J/cm}^2$  (función verde); fluencia de  $27 \text{ J/cm}^2$  (función rosa); fluencia de  $81 \text{ J/cm}^2$  (función azul). Panel D: resumen de resultados para los tiempos de contacto ensayados: 10 min (línea fina); 30 min (línea punteada); 90 min (línea gruesa).

NMB que produce total mortandad celular es de  $100 \mu\text{M}$ , en cambio, para el mismo tiempo de contacto, si se irradia la muestra durante 90 min ( $81 \text{ J/cm}^2$ ) puede disminuirse la concentración de NMB hasta  $50 \mu\text{M}$ .

## Discusión

Hasta la fecha se han realizado diferentes estudios *in vitro* utilizando la TFD como posible tratamiento contra las dermatofitosis; la mayoría de ellos se basan en el empleo del ácido 5-aminolevulínico o sus derivados como FS<sup>8</sup>. En particular, para las onicomicosis el dermatofito más estudiado ha sido *Trichophyton rubrum*. Así, varias publicaciones científicas demuestran que *T. rubrum* puede ser tratado *in vitro* mediante TFD para obtener un efecto fungicida con distintos FS, como el azul de toluidina (*toluidine blue O*)<sup>9</sup>, Sylsens B —triclóruo de 5,10,15-tris(4-metilpiridinio)-20-fenil-[21H,23H]-porfina—<sup>10-14</sup>, deuteroporfirina monometiléster<sup>10-12</sup>, el ácido 5-aminolevulínico<sup>14,15</sup> o la hipericina —1,3,4,6,8,13-hexahidroxi-10,11-dimetilfenantro(1,10,9,8-opqra)perilen-7,14-diona—<sup>16</sup>.

Sin embargo, son escasos los estudios publicados para tratar las micosis producidas por *T. mentagrophytes* con TFDa. Jenefer et al.<sup>17</sup> demostraron en 2010 que este dermatofito puede ser tratado mediante TFDa utilizando acriflavina a una concentración de  $0,2 \mu\text{M}$ , aunque cabe resaltar que no menciona la dosis de luz aplicada. Paz-Cristobal et al.<sup>16</sup> también consiguieron inactivar a *T. mentagrophytes* utilizando hipericina a una concentración entre 20 y  $50 \mu\text{M}$  usando diferentes dosis de luz. Es difícil comparar nuestros resultados con los de estos autores, porque tanto los fotosensibilizadores como las condiciones experimentales empleadas son muy diferentes. Asimismo, frente a *T. mentagrophytes* se han utilizado colorantes de la familia de las fenotiazinas como el NMB<sup>18</sup>.

Las fenotiazinas han resultado ser útiles en la TFD también frente a distintos tipos de bacterias, como la gram-positiva *Staphylococcus aureus* o la gram-negativa *Escherichia coli*<sup>19,20</sup>. De entre ellas, se ha demostrado que el NMB es más eficaz que el azul de metileno, el azul de toluidina O, o el azul de dimetilmetileno frente a cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a antibióticos<sup>21</sup>. Sin embargo, la concentración de NMB necesaria para producir un efecto bactericida sobre *Acinetobacter baumannii* ( $2 \mu\text{M}$  con dosis de luz de  $30 \text{ J/cm}^2$ ) es muy inferior a la necesaria para inactivar a *T. mentagrophytes* CECT 2956, según los resultados obtenidos en este trabajo (50 o  $100 \mu\text{M}$  a  $81$  o  $9 \text{ J/cm}^2$ , respectivamente).

Es un dato conocido que las células de mayor tamaño son menos sensibles a la TFDa que las más pequeñas, hecho que convierte a los eucariotas en más resistentes a la fotoinactivación que las bacterias al poseer un mayor número de blancos por célula<sup>22</sup>. Además, en TFD está generalmente aceptado que el mecanismo tipo II vía oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) es la vía principal que causa el daño celular. El  $^1\text{O}_2$  es una ERO que no se interconvierte con otras ERO, por lo que su principal característica, en relación con su efecto fotodinámico, es su tiempo de vida antes de que regrese a su estado fundamental al transferir su energía. No está claro el valor de este parámetro en el ambiente celular donde el  $^1\text{O}_2$  puede reaccionar con diferentes biomoléculas pero, en cualquier caso, su tiempo de vida útil limita el espacio en que puede moverse a partir del lugar donde es generado y que se calcula en alrededor de  $270 \text{ nm}$ <sup>23</sup>. Esto es una distancia muy corta, incluso en la escala de las dimensiones celulares. Un procarionota típico tiene una longitud de unos pocos micrómetros, mientras que las eucariotas a menudo alcanzan

diámetros de 10-30  $\mu\text{m}$ . En particular, los macroconidios de *T. mentagrophytes* alcanzan un tamaño de 20-50  $\mu\text{m}$  de largo y 6-8  $\mu\text{m}$  de ancho cuando se desarrollan sobre un huésped. En consecuencia, las reacciones primarias del  $^1\text{O}_2$  en una célula tienen lugar en una corta distancia de donde se ha generado, por lo que a nivel molecular, el lugar donde se genera es muy importante. Las reacciones primarias del  $^1\text{O}_2$  con las células vecinas produce ERO secundarias capaces de difundir y provocar un mayor daño oxidativo en las células<sup>24</sup>.

En el trabajo publicado por Rodrigues et al.<sup>18</sup> los autores exponen que el tratamiento de *T. mentagrophytes* ATCC 9533 con NMB a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , con un tiempo de incubación de 30 min y una dosis de luz de 20 J/cm<sup>2</sup>, es suficiente para conseguir que ningún superviviente del dermatofito se desarrolle. Como se ha mostrado en nuestro estudio, la dosis de 10  $\mu\text{M}$  no resultó suficiente en ningún caso para erradicar a la cepa CECT 2956 (ATCC 28443). La comparación de ambos datos apunta a que la susceptibilidad a la TFDa es cepa-dependiente, ya que en ambos casos el tiempo de incubación de las suspensiones fototratadas de forma similar, sembradas e incubadas sobre SB, fue de 14 días.

Por último, cabe mencionar que debido a que el estudio se ha realizado *in vitro*, no pueden extrapolarse sus resultados directamente para el tratamiento de las infecciones fúngicas en pacientes. Las dificultades experimentales no han permitido estudiar los efectos fotodinámicos sobre las hifas de *T. mentagrophytes* ni sobre sus macroconidios, ya que estos raramente son generados por el dermatofito cuando se cultiva en el laboratorio. Sin embargo, los resultados demuestran que el NMB es un FS a tener en cuenta para el tratamiento de las micosis cutáneas causadas por este dermatofito.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

## Financiación

Este trabajo se ha realizado con la ayuda recibida del Ministerio de Economía y Competitividad de España (CTQ2010-20870-C03-01 y CTQ2013-48767-C3-1-R).

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

## Agradecimientos

Los autores también agradecen a SORISA la cesión de un equipo Photocare para la realización de este estudio.

## Bibliografía

1. Nonell N, Agut M, Semino C, Mora M, Sagristá ML, Cañete M, et al. Fundamentos físico-químicos de la terapia fotodinámica. En: Gilaberte Y, coordinador. Monografías de dermatología: terapia fotodinámica en dermatología. Madrid: Grupo Aula Médica, S.L.; 2015. pp. 3-10.
2. Rezusta A, López-Chicón P, Paz-Cristobal MP, Alemany-Ribes M, Royo-Díez D, Agut M, et al. *In vitro* fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida* species. Photochem Photobiol. 2012;88:613-9.
3. Badillet G. Les dermatophytes. Atlas clinique et biologique. Paris: Varia; 1975.
4. Bayó M, Agut M, Calvo MA. Dermatofitosis humanas y caninas: ¿existen dermatofitos zoofílicos y antropofílicos? Rev Reial Acad Med Catalunya. 1994;9:111-8.
5. Pereiro Ferreiros M Jr, Garcia-Martinez FJ, Alonso-Gonzalez J. Update on the treatment of superficial mycoses. Actas Dermatofitología. 2012;103:778-83.
6. Wilson BC, Patterson MS. The physics of photodynamic therapy. Phys Med Biol. 1986;31:327-60.
7. Nielsen KP, Juzeniene A, Juzenas P, Stamnes K, Stamnes JJ, Moan J. Choice of optimal wavelength for PDT: The significance of oxygen depletion. Photochem Photobiol. 2005;81:1190-4.
8. Qiao J, Li R, Ding Y, Fang H. Photodynamic therapy in the treatment of superficial mycoses: An evidence-based evaluation. Mycopathologia. 2010;170:339-43.
9. Amorim JCF, Soares BM, Alves OA, Ferreira MVL, Sousa GR, Silveira LB, et al. Phototoxic action of light emitting diode in the *in vitro* viability of *Trichophyton rubrum*. An Bras Dermatol. 2012;87:250-5.
10. Smijs TG, Bouwstra JA, Schuitmaker HJ, Talebi M, Pavel S. A novel *ex vivo* skin model to study the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment in different growth phases. J Antimicrob Chemother. 2007;59:433-40.
11. Smijs TG, Bouwstra JA, Talebi M, Pavel S. Investigation of conditions involved in the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment. J Antimicrob Chemother. 2007;60:7550-9.
12. Smijs TG, Schuitmaker HJ. Photodynamic inactivation of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. Photochem Photobiol. 2003;77:556-60.
13. Smijs TG, Mulder AA, Pavel S, Onderwater JJ, Koerten HK, Bouwstra JA. Morphological changes of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* after photodynamic treatment: A scanning electron microscopy study. Med Mycol. 2008;46:315-25.
14. Smijs TG, Pavel S. The susceptibility of dermatophytes to photodynamic treatment with special focus on *Trichophyton rubrum*. Photochem Photobiol. 2011;87:2-13.
15. Kamp H, Tietz HJ, Lutz M, Piazena H, Sowyrda P, Lademann J, et al. Antifungal effect of 5-aminolevulinic acid PDT in *Trichophyton rubrum*. Mycoses. 2005;48:101-7.
16. Paz-Cristobal P, Gilaberte Y, Alejandro C, Pardo J, Revillo MJ, Rezusta A. *In vitro* fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Trichophyton* spp. Mycopathologia. 2014;178:221-5.
17. Jenefer S, Raynukaa D, Balaji V, Kaviyaranan V, Ebenezer P. Photodynamic control of *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* by acriflavin, an acridine dye. J Biosci Res. 2010;1:52-7.

18. Rodrigues GB, Ferreira LKS, Wainwright M, Braga GUL. Susceptibilities of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light. *J Photochem Photobiol B: Biology*. 2012;116:89–94.
19. Phoenix DA, Sayed Z, Hussain S, Harris F, Wainwright M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;39:17–22.
20. Ragàs X, He X, Agut M, Roxo-Rosa M, Rocha Gonsalves A, Serra AC, et al. Singlet oxygen in antimicrobial photodynamic therapy: Photosensitizer-dependent production and decay in *E. coli*. *Molecules*. 2013;18:2712–25.
21. Ragàs X, Dai T, Tegós GP, Agut M, Nonell S, Hamblin MR. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: *In vitro* and *in vivo* studies. *Lasers Surg Med*. 2010;42:384–90.
22. Demidova TN, Hamblin MR. Microbial photoinactivation: Effect of cell-photosensitizer binding and cell density. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:2329–35.
23. Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cell and tissues. *J Photochem Photobiol B: Biology*. 1990;6:343–7.
24. Davies MJ, FU SL, Dean RT. Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals. *Biochem J*. 1995;305:643–9.