

ENCAPSULACIÓN DE ÁCIDO Δ -AMINOLEVULÍNICO EN MICROESFERAS DE ALGINATO

Willie Jaikel Zava¹, Keila Alvarado Estrada², Octavio Sánchez Vargas², Rogelio Scougall-Vilchis³, Blanca Silvia González-López³, Amaury Pozos Guillén², Héctor Flores^{2*}

1 Maestría en Endodoncia, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Dr. Manuel Nava #2, Zona Universitaria, C.P. 78290; San Luis Potosí, S.L.P. México

2 Laboratorio de Ciencias Básicas, Facultad de Estomatología, UASLP San Luis Potosí, SLP, México. Correo electrónico: heflores@uaslp.mx

3 Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México

Recibido: Mayo 2013; Aceptado: Diciembre 2013

RESUMEN

Objetivo: Encapsular δ -ALA en microesferas de alginato y evaluar su cinética liberación. **Métodos:** Se utilizó el método de extrusión para la elaboración de microesferas de alginato conteniendo δ -ALA; se observaron las ME al microscopio invertido y se midieron utilizando *ImageJ* 2.0; se evaluó la cinética de liberación de las ME con δ -ALA por medio de la medición del espectro en el UV-Vis con previa curva de calibración; se confirmó la liberación de δ -ALA por medio del espectro observado al espectrofluorómetro, además con el efecto bactericida mostrado al agregar alícuotas de δ -ALA a cultivos 0,5 de *McFarland* de *E. faecalis* y contando las UFC. **Resultados:** Se obtuvieron microesferas cargadas significativamente de mayor tamaño que las blanco (*U de Mann Whitney*: $p < 0,0001$); se observó una liberación en constante crecimiento desde 1 hora hasta los 30 días; la espectrofluorometría reflejó la liberación del δ -ALA al compararlo con la solución blanco. **Conclusión:** Se demostró la encapsulación de δ -ALA en microesferas de alginato, conservando sus propiedades en sus diferentes periodos de liberación. Mostrado a través la disminución en las UFC de los cultivo de *E. faecalis*.

Palabras Claves: Encapsulación, δ -ALA, microesferas, alginato

ABSTRACT

Aim: To encapsulate δ -ALA in alginate microspheres and to evaluate their release kinetics. **Methods:** extrusion method for the preparation of alginate microspheres was used contending δ -ALA; were observed ME by inverted microscope and measured using *ImageJ* 2.0, was evaluated for release kinetics with δ -ALA ME through measuring the spectrum in the UV-Vis with a prior calibration curve; was confirmed δ -ALA release through the spectrofluorometer observed spectrum also showed the bactericidal effect by adding aliquots of δ -ALA crops *McFarland* 0,5 *E. faecalis* and counting the CFU. **Results:** There were significantly higher loaded microspheres larger than white (*Mann Whitney U*: $p < 0,0001$), there was a growing liberation from 1 hour to 30 days spectrofluorometry reflected the release of δ -ALA when compared with the blank solution. **Conclusion:** It was shown that the encapsulation is achieved δ -ALA in alginate microspheres while retaining their properties at different periods of release, showing by reduction in CFUs of the *E. faecalis*.

Key words: Encapsulation, δ -ALA, microspheres, alginate

INTRODUCCIÓN

El propósito y fin primordial del tratamiento endodóntico es la eliminación de la infección bacteriana presente en el sistema de conductos radiculares, para dar paso al proceso de reparación de la periodontitis apical. El tratamiento de conductos convencional, es un procedimiento altamente predecible, con una tasa de éxito que alcanza el 97%, si se llega a restaurar debidamente la pieza tratada; sin embargo, la incapacidad para desinfectar el sistema de conductos puede llevar al fracaso o a la persistencia de la patología apical [1]. Desafortunadamente, las preparaciones biomecánicas no pueden realizarse de manera que el conducto quede completamente libre de bacterias. El reto

más grande que enfrenta el clínico es la complejidad morfológica del sistema de conductos, particularmente los molares, y la organización de la microflora bacteriana en biofilms dentro de estos [2].

En endodoncia, el irrigante más comúnmente utilizado es el hipoclorito de sodio, debido a sus propiedades como agente antibacteriano y la disolución de tejidos orgánicos, entre otras [3]. Sin embargo, posee efectos citotóxicos y puede provocar reacciones inflamatorias en caso de sobrepasar a los tejidos circundantes, por esta razón, debe utilizarse solamente dentro de los conductos radiculares [4]. En casos de retratamiento, agudizaciones o fracaso endodóntico, se utiliza como coadyuvante la antibioticoterapia. Sin embargo, su utilización a largo plazo, ha provocado resistencia bacteriana [5]. Debido a esto, es necesaria la búsqueda de alternativas, no tóxicas de desinfección, donde la posibilidad de resistencia bacteriana sea mínima.

Un método reciente para disminuir los patógenos orales, es el uso de la terapia fotodinámica (TFD), la cual se define como la irradiación emitida por un láser de baja potencia que activa una sustancia fotosensible; ésta última produce un efecto letal sobre un grupo de células específicas. El fin es promover la liberación de especies reactivas de oxígeno, que pueden causar destrucción de la membrana celular bacteriana en ciertos casos, y en otros la inhibición de enzimas, o ambas. En trabajos pasados, se utilizó la terapia fotodinámica con agentes fotosensibilizantes como la Verteporfina y el ácido δ -aminolevulínico [6,7] en *E.faecalis* en estado planctónico y biofilm respectivamente, con resultados que demuestran la utilidad de estos fotosensibilizantes como agentes antibacterianos, por lo cual el paso a seguir es lograr encapsularlos para su utilización como medicamento de liberación controlada.

El objetivo del presente estudio fue encapsular δ -ALA en microesferas de alginato, evaluando su cinética de liberación. De la misma manera se evaluó la eficiencia de carga y recuperación de las microesferas. Para posteriormente determinar la liberación de Ptoporfirina IX (PpIX) por medio espectrofluorometría.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y equipos. Para la elaboración de las microesferas, se utilizó el método de extrusión por goteo. La metodología se desarrolló de la siguiente manera: Se preparó una solución de 150 mg por 10 mL de alginato de sodio (*Sigma, St. Louis, MO*) en agua destilada, y se dejó en agitación constante durante 10 minutos. A la solución anterior se le agregaron 10 mg de clorhidrato de ácido aminolevulínico (*Sigma-Aldrich*), y se dejó en agitación otros 10 minutos. Por separado, se preparó una solución de 1,1 g/100 mL de cloruro de calcio (*Sigma-Aldrich*) en agua destilada, y se vertió sobre un recipiente amplio de vidrio (*Pyrex, World Kitchen México*). La primera solución se vertió sobre la segunda utilizando aerógrafo (*Goni 34000, USA*) a 10 cm del recipiente para

formar las microesferas. Una vez formadas, se recuperaron por medio de filtración con papel filtro con porosidad de 2 micrones (*Millipore Corporation, Billerica, MA, USA*), y se hicieron lavados con alcohol para eliminar los excesos del cloruro de calcio. Posteriormente, se dejaron secando durante 24 horas y se pasaron a un tubo de ensayo cubierto para mantenerlas en refrigeración. Se utilizó el mismo procedimiento para las microesferas blanco, sin adicionar δ -ALA. El procedimiento se realizó por triplicado para ambos tipos de microesferas.

Tamaño de las microesferas de alginato. Se obtuvo el diámetro de las microesferas, colocando 1ml de la solución de cloruro de calcio conteniendo las ME sobre un porta objetos, para después observarlas bajo el microscopio invertido (*Leica DM IL LED, Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Germany*). Posteriormente, se procedió a tomar fotografías de las mismas con un aumento de 40X. Las fotografías fueron analizadas con el programa *ImageJ* versión 2.0 (*Wayne Rasband, NIH, USA*), con el cual se realizó la medición del diámetro de las ME.

Eficacia de recuperación. Para determinar la cantidad de microesferas producidas, se calculó el porcentaje del peso obtenido de la cantidad de material sólido utilizado para su elaboración de acuerdo a la fórmula (1):

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{Peso de las ME}}{\text{Material Sólido}} \times 100 \quad (1)$$

Eficacia de carga. Para conocer la eficacia de carga, se diluyeron 3 mg de microesferas en 3 ml de PBS, y se sometieron a disrupción sónica, liberando así el contenido de δ -ALA. Una vez liberado, la solución es llevada al espectrofotómetro para obtener la lectura de absorbancia, la cual corresponde a una determinada cantidad de δ -ALA, de acuerdo con la curva de calibración realizada inicialmente, de acuerdo con la fórmula (2):

$$\% \text{ de Carga} = \frac{\text{Absorbancia obtenida} \times 100}{\text{Absorbancia de la calibración}} \quad (2)$$

Cinética de liberación. Para evaluar la cinética de liberación del δ -ALA, se suspendió 1 mg de microesferas cargadas en 1 mL de PBS en tubos de ensayo, dejándolos a 37°C. Se realizó la recolección de la solución en los siguientes períodos: 1, 3, 9, 12, 24, 48 h, y 7, 14, y 30 días. Antes de cada recolección, los tubos se centrifugaron a 5.000 rpm por 3 minutos. Las alícuotas obtenidas fueron observadas al UV-Vis (*Modern Sciences M7552, USA*) a 264 nm para determinar la concentración de δ -ALA liberada. Previamente se realizó una curva de calibración para obtener las concentraciones con base en la absorbancia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Detección de PpIX endógena. Para determinar que efectivamente el δ -ALA permanecía estable después de su encapsulación, se confirmó por la producción de PpIX endógena por parte de *E. faecalis*. Se colocaron 2 mL de inóculo a 0,5 en la escala de *McFarland*, y 1 mL de la solución experimental (7, 14, y 30 días). Se dejaron por 3 horas en incubación a 37°C protegidos de la luz, en movimiento constante (*Agitador Orbitario Glas-Col Terre Haute IN, USA*). El ensayo se realizó por triplicado. Se tomó 1 mL de esta muestra para posteriormente evaluar el efecto bactericida. Se centrifugaron las muestras a 5.000 rpm (*Centrifuge Eppendorf 5810R, USA*) por 12 minutos y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla celular con 2 mL de PBS, y se volvió a centrifugar esta vez a 5.000 rpm por 5 minutos. La pastilla se resuspendió en 2 mL de solución etanol, dimetil sulfóxido (DMSO) ácido acético (80:20:1 v/v/v) para la disrupción de las células, además de someterlas a disrupción sónica por 5 ciclos de 5 segundos a 0 grados. Se centrifugó nuevamente a 5.000 rpm por 3 minutos y el sobrenadante fue tomado y se llevó en cubetas de cuarzo para su lectura al espectrofluorómetro (*PTI Photon Technology International M5020, USA*) a una excitación de 382 nm en un barrido de 400 a 600 nm para determinar la presencia de PpIX.

Se calcularon las medidas de tendencia central y dispersión de los datos. Estos están expresados como promedio y desviación estándar del diámetro de las microesferas. Las diferencias en diámetro entre microesferas blanco y cargadas se examinaron por medio de la prueba *U* de *Mann Whitney*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los microorganismos juegan un papel crucial en el desarrollo de las lesiones pulpaes y periapicales. Específicamente, *E. faecalis* tiene especial protagonismo por su resistencia a antibióticos y capacidad de formar un biofilm, el cual dificulta la penetración de los agentes antibacterianos [8,9].

El hipoclorito de sodio se recomienda como el principal irrigante de conductos por su amplio espectro bactericida, disolución de barro dentinario así como prevenir su formación, y la capacidad de disolver tejido orgánico. Sin embargo, ha demostrado tener efectos citotóxicos en tejido vital, lo que puede provocar reacciones inflamatorias si se sobrepasa al periápice [5]. En casos de fracaso endodóntico, retratamiento, retratamiento quirúrgico o extracción, se utiliza la antibióticoterapia y antisépticos como terapias adjuntas. Sin embargo, han contribuido al desarrollo de la resistencia por parte de los microorganismos. Por ello existe una necesidad cada vez mayor de encontrar alternativas a los métodos actuales de desinfección. Debido a esto, la TFD ha crecido desde los trabajos a principios del siglo XX por parte de *Raab* [10], sobre todo por la creciente necesidad de encontrar alternativas viables y no tóxicas de desinfección, para contrarrestar los efectos indeseados de los medicamentos actuales.

Para encapsular δ -ALA, se utilizó alginato de algas pardas, ya que posee diferentes ventajas sobre otros métodos, como la falta de uso de solventes orgánicos para su elaboración, alta porosidad y difusión de moléculas, baja inmunogenicidad y biocompatibilidad [13]. Existen tres maneras de formar microesferas con alginato. La primera y más simple es la de extrusión por goteo, donde se coloca una solución de alginato junto con la proteína a encapsular, en un atomizador o spray. Luego se rocía sobre una solución gelificante de cloruro de calcio donde se formarán las microesferas [12]. La segunda es por emulsión aceite en agua (o-w), donde se utilizan solventes químicos fuertes como el éter etílico, para remover el aceite al final del proceso [13]. La tercera es la coacervación de polielectrolitos cargados opuestamente, donde dos soluciones con cargas opuestas se separan, dependiendo del pH, fuerza iónica y la cantidad de solución polielectrolítica [14]. El presente estudio se utilizó la primera por su simplicidad, y facilidad de manipular la forma en que se forman las partículas.

Tamaño de la partícula. El tamaño de las partículas con δ -ALA del presente trabajo fue de un promedio de 41 (\pm 9 μm), y el de las partículas blanco fue de 34 (\pm 8 μm), obteniendo diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre ambos tamaños, la Figura 1 se pueden observar estos resultados.

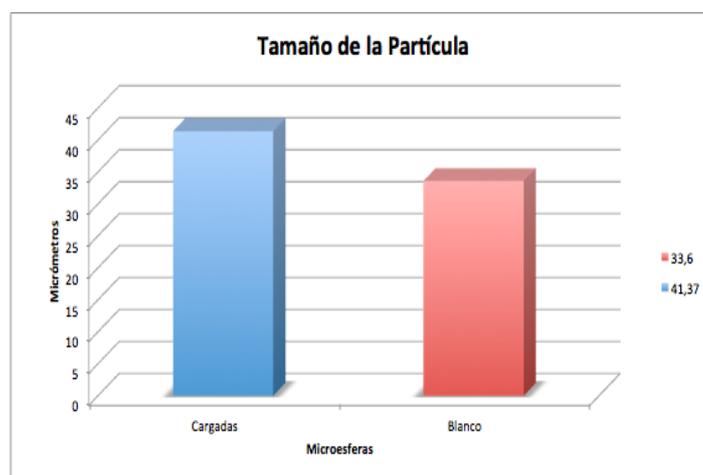


Figura 1. Tamaño de las microesferas cargadas y blanco. Los datos son expresados en micrómetros.

Esto debido a que al encapsular una proteína, la matriz polisacárida adopta la morfología de la misma, obteniendo usualmente microesferas de tamaños mayores (como núcleos de crecimiento), y con formas irregulares, en comparación con las esferas vacías [11]. Además la solución cargada con δ -ALA, presentaba una mayor viscosidad debido a la proporción polvo/líquido de la misma. Este diámetro es menor a lo reportado por *Martín et al* en 2007 [15] para microesferas de alginato, quien registró un promedio de 96,96 μm por partícula. Un menor tamaño de partícula podría ser de

utilidad en el área endodóntica, ya que con una menor viscosidad de la medicación intraconducto, podría significar mayor fluidez hacia los conductos accesorios y el periápice.

Eficacia de recuperación. La eficacia de recuperación obtenida fue de un 60.95%. Esto es debido a la metodología utilizada, ya que al realizar la extrusión, cierta cantidad de solución se llega a perder en el ambiente, y no logra llegar a la solución gelificante. Por otro lado, los restos del gel neoformado en las paredes del recipiente no se pudieron recuperar sin alterar las propiedades físicas de las microesferas. Existen reportes en los cuales el porcentaje va de un 50 a un 87% [16,17] sin especificación de un porcentaje que se considere adecuado. Por lo cual el porcentaje obtenido es adecuado para este estudio, ya que es inminente la pérdida de material durante la preparación de las microesferas.

Eficacia de carga. La media del porcentaje de carga fue del 59,76%, al interpolar el resultado con la curva de calibración que se efectuó previamente. Los reportes de encapsulación de δ -ALA se han realizado en liposomas o microesferas lipídicas. *Di Venosa y cols.* reportan una carga máxima de 5% en liposomas, al utilizar 2 mM de δ -ALA sólo, y porcentajes todavía menores al utilizar mayores concentraciones, debido a una saturación de la solución donde las bicapas de lípidos no pueden incorporar más medicamento. También reportan haber aumentado este porcentaje hasta un 70% utilizando He-ALA (ALA-hexil éster), y 87% con Und-ALA (ALA-undecanoíl éster), debido a la interacción de los ésteres con la bicapa lipídico [12]. *Kosobe y cols* encapsularon δ -ALA en liposomas multilaminares compuesto de DPCC-colesterol (7:3), con una eficacia de carga de 5,5% [19]. *Han y cols.* encapsularon δ -ALA en vesículas lipídicas a una concentración de 100 mg/mL y 1 M de δ -ALA. Ellos obtuvieron un porcentaje que varía entre 47 y 62% [20] Además, *Pierre y cols* prepararon liposomas de δ -ALA con ceramida (50%), colesterol (28%), ácido palmítico (17%), y α -tocoferol (5%), para obtener un porcentaje de carga de 5,7% [17].

La cantidad de proteína cargada depende de diferentes factores como lo son el peso molecular, que en caso del δ -ALA es de 167,8 D, la cantidad de reactivo utilizado, o la relación entre el polímero y la proteína. Ya que nosotros no encontramos reportes previos de la encapsulación de δ -ALA en microesferas de alginato, el porcentaje obtenido podría deberse a una buena adsorción del δ -ALA por parte del alginato.

Cinética de liberación. La liberación del δ -ALA se pudo observar como un aumento en la concentración del mismo a lo largo del tiempo, siendo sustancialmente mayor después de los 7 días de que en las primeras 48 horas. Se logró ver una meseta en la liberación de las 24-48 horas, pero a largo plazo el aumento fue constante (Figura 2).

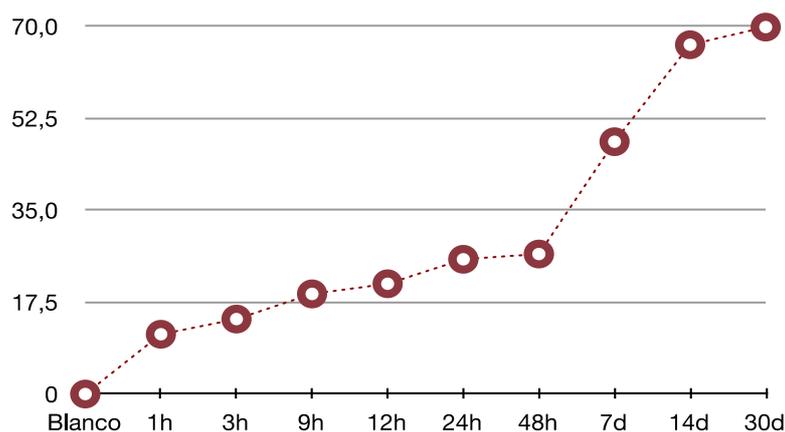


Figura 2. Liberación de δ -ALA a los diferentes tiempos de evaluación, expresado en $\mu\text{g/mL}$.

Al medir la liberación de δ -ALA se pudo observar un aumento constante en la concentración en las diferentes mediciones durante los 30 días. Después de las primeras 48 horas, el aumento fue mayor, lo que sugiere su potencial uso en la terapia endodóntica. Llevando a cabo desinfecciones repetidas a diferentes periodos de tiempo, disminuyendo así las posibles agudizaciones. Se necesitan más investigaciones para esto, como estudios experimentales *in vitro* en piezas dentales extraídas para evaluar la desinfección, y posteriormente ensayos clínicos que evalúen la acción bactericida a diferentes periodos de las microesferas cargadas con δ -ALA.

Detección de PpIX endógena. En la Figura 3 se muestran los espectros de las lecturas de las muestras llevadas a espectrofluorimetría donde tres alícuotas presentan pico de emisión a los 428 nm, el cual está dentro de lo que corresponde a la PpIX. La lectura de la solución blanco (DMSO solo), muestra un espectro menor, así como su absorbancia.

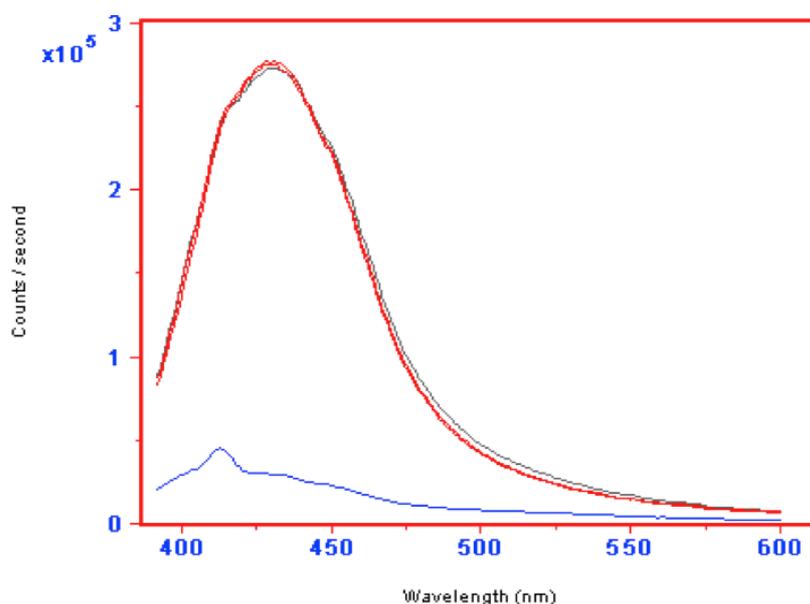


Figura 3. Espectro de las 3 muestras de liberación de δ -ALA con respecto al grupo control DMSO solo (línea azul).

Aunque se han utilizado sustancias diferentes como agentes sensibilizantes para el uso endodóntico y odontológico en general, se eligió el δ -ALA para este estudio debido a las propiedades mencionadas, y su creciente utilización en el área oncológica como más recientemente en el área microbiológica, con estudios que mencionan su efecto sobre *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S.aureus* entre otros [20]. Debido a que δ -ALA no es un agente sensibilizante por sí mismo, sino que induce la producción endógena de PpIX por parte de las células, es posible que su efecto bactericida sea mayor que el de los demás agentes, que actúan por medio de la penetración en la membrana plasmática, puesto que existen cepas capaces de resistir dicha penetración, haciendo que la terapia sea ineficaz [19]. Fontinos y cols. 2008 reportaron que existe suficiente acumulación de protoporfirinas fotoactivadas en varias de cepas de microorganismo gram+ y gram-, con lo cual se pudo realizar una buena desinfección por fotoactivación [20]. Szocs y cols. Reportaron el efecto del δ -ALA utilizando *E.coli*, donde concluyen que existe una liberación endógena de PpIX por parte de las bacterias, y que éstas puede ser destruidas por medio de la terapia fotodinámica, no así por la toxicidad del δ -ALA en sí [9]. En este estudio se pudo observar que la sustancia liberada, es en realidad δ -ALA, y que no sufrió cambios en su estructura o capacidad, haciendo que se liberara de manera endógena la PpIX por parte de *E.faecalis*, confirmándolo por medio de espectrofluorometría. El pico de absorbancia de las 3 muestras fue mayor que la solución blanco de DMSO (dimetil sulfóxico), alcanzando dicho pico a los 438 nm, lo cual corresponde a la longitud de onda de la PpIX.

CONCLUSIONES

Se logró la encapsulación de δ -ALA en microesferas de alginato, obteniendo tamaños de partículas pequeñas y constantes, y se demostró que conserva sus propiedades en sus diferentes periodos de liberación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R “The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats”, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **20**, 340 (1965)
- [2] Byström A, Sundqvist G “Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy” *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*, **55**, 307 (1983)
- [3] Bergmans L, Moisiadis P “Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo”, *Int Endod J.*, **41**, 227 (2008)
- [4] Siqueira, JE Jr “Aetiology of root canal treatment failure: why well treated teeth can fail”, *Int Endod .*, **34**, 1 (2001)
- [5] Zehnder M “Root canal irrigants”, *J Endod*, **32(15)**, 389 (2006)
- [6] Möller AJR “Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth”, *Odontologisk Tidskrift*; **74** (special issue), 1 (1966)
- [7] Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M “*Enterococcus faecalis*—the root canal survivor and star in post-treatment disease”, *Endo Top*, **6**, 135 (2003)
- [8] Lee MT, Philip S. Bird, Walsh LJ “Photo-Activated Disinfection of The Root Canal: A New Role For Lasers In Endodontics”, *Aust Endod J.*, **30(3)** (2004)
- [9] Szocs K, Gabor G E. Csik, Fidy J “Aminolevulinic acid-induced porphyrin synthesis and

- photodynamic inactivation of Escherichia coli B", *J. Photochem. Photobiol. B., Biol.*, **SO**, 8 (1999)
- [10] Smidsrød O, Gudmund Skja k-Brk "Alginate as immobilization matrix for cells", *Trends Biotechnol.*, **8**, 71 (1990)
- [11] Di Venosa G, Hermida L, Batlle A, Haydée Fukuda, Casas A "Characterisation of liposomes containing aminolevulinic acid and derived esters", *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **92**, 1 (2008)
- [12] Wan LS, Heng PW, Chan LW "Drug encapsulation in alginate microspheres by emulsification", *J. Microencap.*, **9**, 309 (1992)
- [13] Schuh J, Fanslow W, Gombotz W, Wee SF "Intranasal localization and antibody response to polycation coated ova-encapsulated alginate microbeads", *Vet. Pathol.*, **33(5)**, 581 (1996)
- [14] Zach L, Cohen G "Pulp response to externally applied heat", *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; **95**, 5 (1965)
- [15] Martín-Pérez A, Cerda-Tristerna B, Flores-Reyes HE, Oliva-Rodríguez R. Diseño y Caracterización de un sistema de microencapsulación con liberación prolongada de albúmina de suero bovino. *Tesis presentada como requisito para optar por el título de Maestro en Endodoncia, UASLP.* (2007)
- [16] Porjazoska A, Goracinova K, Mladenovska K, glavaš M, Simonovska M, Janjević E, Cvetkovska M. Poly (lactide-co-glycolide) as systems of controlled release proteins-Preparation and characterization. *Acta Pharm*; **54**: 215-229 (2004)
- [17] Kosobe T, Moriyama E, Tokuoka Y, Kawashima N "Size and surface charge effect of 5-aminolevulinic acid-containing liposomes on photodynamic therapy for cultivated cancer cells", *Drug Dev Ind Pharm.*, **31**, 623 (2005)
- [18] Han I, Jun M, Kim J. Expression and intensity of protoporphyrin IX induced by liposomal 5-aminolevulinic acid in rat pilosebaceous unit throughout hair cycle. *Arch Dermatol Res.*, **297**, 210 (2005)
- [19] Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM "5-Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy: Principles and Experimental Research", *Photochem. Photobiol.*, **65**, 235 (1997)
- [20] Fontinos N, Campo MA, Popowycz F, Gurny R, Lange N "Effects on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria Mediated by 5-Aminolevulinic Acid and 5-Aminolevulinic Acid Derivatives", *Antimicrob Agents Chemother*, **4**, 1366 (2008)