UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito da inativação fotodinâmica com fotossensibilizadores fenotiazínicos em microconídios não germinados e germinados dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium solani*

Henrique Dantas de Menezes

Ribeirão Preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito da inativação fotodinâmica com fotossensibilizadores fenotiazínicos em microconídios não germinados e germinados dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium solani*

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientado: Henrique Dantas Menezes

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Marcia Regina von Zeska Kress

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

de Menezes, Henrique Dantas

Efeito da inativação fotodinâmica com fotossensibilizadores fenotiazínicos em microconídios não germinados e germinados dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium solani*, Ribeirão Preto, 2017.

127 p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Kress, Marcia Regina von Zeska

1. Inativação fotodinâmica de fungos. 2. Fotossensibilizadores fenotiazínicos. 3. *Fusarium oxysporum*. 4. *Fusarium moniliforme*. 5. *Fusarium solani*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Henrique Dantas de Menezes

Título do trabalho: Efeito da inativação fotodinâmica com fotossensibilizadores fenotiazínicos em microconídios não germinados e germinados dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium solani*

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientado: Henrique Dantas Menezes

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marcia Regina von Zeska Kress

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Geraldo e Eleusa pelo apoio, amor, carinho e pelos conselhos que foram fundamentais para me guiar em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão Renato pela amizade.

A minha namorada Sandra pela paciência, amor e carinho, obrigado por fazer parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof.^a Dr.^a. Marcia Regina von Zeska Kress, por me receber em seu laboratório, pela orientação, pelas discussões científicas que sempre me ajudaram. Agradeço por ter sempre me incentivado na execução do meu trabalho, e motivando meu crescimento intelectual e acadêmico, tornando o período do doutorado um momento de tranquilidade mesmo diante das dificuldades encontradas.

Ao Prof. Dr. Roberto Santana da Silva, por disponibilizar os equipamentos do seu laboratório e pelas discussões científicas, sempre valiosas.

Ao técnico Eduardo Tozatto do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP pela colaboração nas análises microscópicas dos microconídios não germinados e germinados dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium solani*.

À técnica Fabiana Rossetto de Moraes do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP pelo auxílio técnico em todas as análises de citometria de fluxo, realizadas.

Ao meu amigo Guilherme Brancini por ter me ajudado na execução dos experimentos de carbonilação de proteínas e na confecção dos géis 2D de proteínas.

A todos os amigos e colegas do laboratório: Érika, Vanessa, Patrícia, Mario, Tiago. Muito obrigado por vocês terem tido paciência comigo e me ajudarem em tantas coisas.

Aos técnicos Ludmilla Tonani Carvalho e Fernando Grine Martins pela valiosa contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus amigos que, direta ou indiretamente, me ajudaram na realização deste trabalho.

A toda minha família por sempre acreditar em mim. Aos meus pais Geraldo e Eleusa, e Irmãos Renato e Marcela, pelo imenso apoio. Obrigado a vocês por compartilharem os prazeres e dificuldades desta jornada.

Agradeço a minha namorada Sandrinha, por estar sempre comigo, me ajudando nos momentos de dificuldade e participando e fazendo companhia nas minhas alegrias.

Agradeço a Deus, que me deu a vida, quem primeiro me amou e fez com que eu trilhasse esse caminho. Agradeço senhor, por cada dificuldade encontrada no desenvolvimento deste trabalho, visto que foram elas que me fizeram crescer e aprender.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento (Processo - 2015/05853-7).

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
RESUMEN.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Princípios gerais da inativação fotodinâmica.....	1
1.2. Fotossensibilizadores.....	4
1.3. Fontes de luz utilizadas na inativação fotodinâmica.....	6
1.4. Inativação fotodinâmica de fungos.....	6
1.5. Sistema biológico.....	8
2. Objetivos.....	10
2.1. Objetivo geral.....	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
3. Materiais e métodos.....	11
3.1. Espécies utilizadas e condições de crescimento.....	11
3.2. Fotossensibilizadores.....	11
3.3. Sistema de iluminação.....	13
3.4. Determinação do coeficiente de absorvidade molar dos FS e irradiância espectral efetiva do LED.....	14
3.5. Cálculo do rendimento quântico de oxigênio singlete (ϕ_{Δ}) dos fotossensibilizadores fenotiazínicos.....	14
3.6. Avaliação da atividade metabólica de microconídios não germinados e 4 h-germinados de <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> e <i>F. solani</i>	16
3.7. Determinação dos parâmetros ótimos para a IFA dos microconídios não germinados das espécies de <i>Fusarium</i> com os FS fenotiazínicos pela determinação da concentração inibitória mínima.....	16
3.8. Determinação da fração de sobreviventes dos microconídios não germinados e 4 h-germinados das espécies de <i>Fusarium</i> na IFA com os FS fenotiazínicos.....	17
3.9. Estudo microscópico da interação dos microconídios não germinados e 4 h-germinados com os fotossensibilizadores fenotiazínicos.....	18
3.10. Avaliação do efeito da IFA na permeabilidade da membrana celular de microconídios de <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> e <i>F. solani</i>	19
3.11. Avaliação do efeito da IFA na peroxidação de lipídios de microconídios de <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> e <i>F. solani</i>	20
3.12. Avaliação do efeito da IFA na carbonilação de proteínas de microconídios de <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> e <i>F. solani</i>	20
3.12.1. Inativação fotodinâmica antimicrobiana.....	20
3.12.2. Extração e quantificação de proteínas.....	21
3.12.3. Análise de carbonilação de proteínas.....	21
3.13. Efeito da IFA na fragmentação do núcleo de microconídios não germinados e 4 h-germinados de <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> e <i>F. solani</i>	22
3.14. Avaliação da virulência das espécies de <i>Fusarium</i> sp. utilizando o modelo invertebrado <i>Galleria mellonella</i>	23
3.15. Efeito da IFA com os FS fenotiazínicos na sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com microconídios de <i>F. moniliforme</i>	23
3.16. Análise estatística.....	24

4. Resultados.....	25
4.1. Determinação da absorvidade molar dos fotossensibilizadores fenotiazínicos e irradiância espectral efetiva do LED.....	25
4.2. O rendimento quântico de oxigênio singlete (ϕ_{Δ}) dos fotossensibilizadores fenotiazínicos.....	27
4.3. Avaliação da atividade metabólica de microconídios não germinados e 4 h-germinados de <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> e <i>F. solani</i>	30
4.4. Determinação dos parâmetros ótimos para a inativação fotodinâmica antimicrobiana dos microconídios não germinados das espécies de <i>Fusarium</i> com os fotossensibilizadores fenotiazínicos pela determinação da concentração inibitória mínima.....	31
4.5. Avaliação da eficácia da inativação fotodinâmica antimicrobiana nos microconídios não germinados e 4 h-germinados das espécies de <i>Fusarium</i> com os fotossensibilizadores fenotiazínicos pela determinação da fração de sobreviventes.....	32
4.5.1. Determinação da fração de sobreviventes de microconídios não germinados e 4 h-germinados das espécies de <i>Fusarium</i> , tratados com os fotossensibilizadores fenotiazínicos, lavados ou não, antes da inativação fotodinâmica antimicrobiana.....	33
4.5.2. Estudo microscópico da interação dos microconídios não germinados e 4 h-germinados com os fotossensibilizadores fenotiazínicos.....	36
4.5.3. Avaliação do efeito da adição dos antioxidantes, manitol, azida de sódio e glutathione reduzida, na inativação fotodinâmica antimicrobiana com os fotossensibilizadores fenotiazínicos.....	40
4.5.4. Avaliação do efeito da adição de cloreto de zinco aos fotossensibilizadores fenotiazínicos na inativação fotodinâmica antimicrobiana.....	45
4.6. Avaliação do efeito da IFA na permeabilidade da membrana celular.....	49
4.7. Avaliação do efeito da IFA na peroxidação de lipídios de microconídios de <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> e <i>F. solani</i>	51
4.8. Avaliação do efeito da IFA na carbonilação de proteínas de microconídios de <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> e <i>F. solani</i>	53
4.9. Efeito da IFA na fragmentação do núcleo de microconídios não germinados e 4 h-germinados de <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> e <i>F. solani</i>	54
4.10. Avaliação da virulência das espécies de <i>Fusarium</i> utilizando o modelo invertebrado <i>Galleria mellonella</i>	57
4.11. Efeito da IFA com os fotossensibilizadores fenotiazínicos na sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com microconídios de <i>F. moniliforme</i>	58
5. Discussão.....	60
6. Conclusão.....	71
7. Referências bibliográficas.....	72
Apêndice.....	82
Anexo.....	95

RESUMO

De Menezes, H. D. **Efeito da inativação fotodinâmica com fotossensibilizadores fenotiazínicos em microconídios não germinados e germinados dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium solani***. 2017. 127f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Fusarium é um grande gênero de fungos filamentosos amplamente distribuídos que são importantes patógenos de plantas, animais e humanos. As doenças causadas por *Fusarium* spp. geram grandes perdas econômicas na produção de frutas, legumes, cereais e de celulose. Em humanos, o controle da fusariose com apenas um antifúngico é ineficaz, apresentando uma elevada taxa de mortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos. A maior resistência aos fungicidas utilizados atualmente tem estimulado o desenvolvimento de novas tecnologias mais eficazes para o controle de fungos patogênicos. Assim, é necessária a busca de alternativas para o controle de microrganismos em ambas as áreas, clínica e agrícola. A inativação fotodinâmica antimicrobiana (IFA) é uma promissora plataforma antifúngica alternativa que pode ser utilizada para controlar o inóculo de fungos em mamíferos e no meio ambiente. A IFA baseia-se na utilização de um fotossensibilizador (FS) que se acumula na célula fúngica alvo. A exposição do FS à luz com um comprimento de onda apropriado, inicia um processo fotoquímico que produz espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente o oxigênio singlete, causando um dano oxidativo não específico levando a morte da célula fúngica, sem dano significativo às células do hospedeiro. Em comparação com os fungicidas utilizados atualmente, a multiplicidade dos danos causados pelas EROs, reduzem a chance de selecionar microrganismos tolerantes. No presente trabalho, avaliamos o efeito da IFA com a combinação de luz vermelhas com fluências de 10 e 15 J cm⁻² e cinco FS fenotiazínicos, azul de metileno (MB), azul de toluidina O (TBO), novo azul de metileno N fórmula sem zinco (NMBN), novo azul de metileno N fórmula com zinco (NMBN Zn) e um novo fenotiazínico pentacíclico S137, em microconídios não germinados e 4 h-germinados de *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*. A IFA com NMBN Zn resultou em uma redução de aproximadamente 5-logs na sobrevivência dos microconídios não germinados (quiescentes) e 4 h-germinados (metabolicamente ativos) das três espécies de *Fusarium* quando expostas a luz na fluência de 15 J cm⁻². A lavagem dos microconídios não germinados e 4 h-germinados para retirar o excesso de FS antes da exposição à luz reduziu, porém não impediu a morte provocada pela IFA. A IFA com todos os FS e fluência aumentou a permeabilidade da membrana celular dos microconídios nas três espécies de *Fusarium*. O dano oxidativo causado pelas EROs produzidos durante o processo fotoquímico da IFA foi avaliado nos lipídios, proteínas e DNA dos microconídios das espécies de *Fusarium*. Foi observado um aumento da peroxidação lipídica em microconídios das três espécies de *Fusarium* após a IFA com NMBN Zn e S137. Observamos o aumento na carbonilação de proteínas em microconídios de *F. oxysporum* após IFA subletal com todos os FS. O aumento no dano do DNA em microconídios não germinados e 4 h-germinados foi observado apenas para o S137 na fluência de 0, 10 e 15 J cm⁻². Nossos estudos expandem a compreensão da inativação fotodinâmica de fungos filamentosos.

Palavras-chave: Inativação fotodinâmica antimicrobiana, Fotobiologia de fungos, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium solani*.

ABSTRACT

De Menezes, H. D. **Effect of photodynamic inactivation with phenothiazinium photosensitizers on non-germinated and germinated microconidia of the fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium solani***. 2017. 127f. Thesis (Doctorate). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Fusarium is a large genus of filamentous fungi widely distributed which are important pathogens of plants, animals and humans. Crop diseases caused by *Fusarium* generate great economic losses in the production of fruit, vegetables, cereals, and cellulose. In humans the control of progression of fusariosis by single-agent antifungal therapy is problematic, leading to a high mortality rate, especially with immunocompromised patients. The increased tolerance to currently used fungicides has stimulated the development of novel and effective technologies to control pathogenic fungi. Thus, the search for alternatives to control microorganisms is necessary in both, clinical and agricultural areas. Antimicrobial photodynamic treatment (APDT) is a promising alternative antifungal platform that can be used to control fungi both in mammalian hosts and in the environment. APDT is based on the use of a photosensitizer (PS) that accumulates in the target fungal cell. The exposure of the PS to light of an appropriate wavelength starts a photochemical process that produces reactive oxygen species (ROS), especially singlet oxygen, leading to non-specific oxidative damage causing the death of the fungal cell without significant harm to the host cells. In comparison with currently used fungicides, the multiple and variable targets of ROS reduce the chance of selecting tolerant microorganisms. In the present study, we evaluated the effect of APDT with the combination of red light with fluence of 10 and 15 J cm⁻², and five phenothiazinium photosensitizer, methylene blue (MB), toluidine blue O (TBO), new methylene blue N zinc free form (NMBN), new methylene blue N zinc chloride double salt (NMBN Zn) and a novel pentacyclic phenothiazinium S137, on ungerminated and germinated microconidia of *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani*. APDT with NMBN Zn resulted in a reduction of approximately 5 logs in the survival of the quiescent ungerminated microconidia and metabolically active germinated microconidia of the three *Fusarium* species when the light fluence of 15 J cm⁻² was applied. Washing out the PS from both ungerminated and germinated microconidia before light exposure reduced but did not prevent the killing effect of APDT. APDT with all the PS and fluences increased cell membrane permeability for the three *Fusarium* species. The oxidative damage caused by ROS produced during the photochemical process of APDT, was evaluated in the lipids, proteins and DNA present in the microconidia. Increases in lipid peroxidation in microconidia of the three *Fusarium* species were observed only after APDT with NMBN Zn and S137. Proteins oxidative damage was observed by the increase in protein carbonylation in microconidia of the *F. oxysporum* after APDT with all PS. The increases in DNA damage from both ungerminated and germinated microconidia was observed only for S137 at fluence of 0, 10 and 15 J cm⁻². Our study expands the understanding of photodynamic inactivation in filamentous fungi.

Keywords: Antimicrobial photodynamic treatment, Fungal photobiology, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium solani*.

RESUMEN

De Menezes, H. D. **Efecto de la inactivación fotodinâmica com fotosensibilizadores de fenotiazinio en microconidios no germinados y germinados de los hongos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani***. 2017. 127f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Fusarium es un gran género de hongos filamentosos ampliamente distribuidos que tiene importantes patógenos de plantas, animales y humanos. Las enfermedades de los cultivos causadas por *Fusarium* spp. generan grandes pérdidas económicas en la producción de frutas, legumbres, cereales y la celulosa. En los seres humanos, el control de la progresión de la fusariose con la terapia antifúngica es ineficaz, lo que conduce a una elevada tasa de mortalidad, especialmente en paciente inmunocomprometidos. El aumento de la tolerancia a los fungicidas que se utilizan actualmente ha estimulado el desarrollo de nuevas tecnologías más eficaces para el control de hongos patógenos. Por lo tanto, la investigación de alternativas para el control de microorganismos es necesario en ambas áreas, clínica y en la agricultura. La inactivación fotodinâmica antimicrobiana (IFA) es una plataforma antifúngica alternativa muy prometedora que puede utilizarse para controlar hongos en mamíferos y en el ambiente. La IFA se basa en el uso de un fotosensibilizador (FS) que se acumula en la célula fúngica de destino. La exposición del FS a la luz con una longitud de onda apropiada, se inicia un proceso fotoquímico que produce especies reactivas del oxígeno (EROs), en particular el oxígeno singlete, causando un daño oxidativo no específica que causa la muerte de la célula fúngica sin daño significativo a las células hospedadoras. En comparación con fungicidas utilizados en la actualidad, los múltiples y variables daños del EROs reducen la posibilidad de selección de microorganismos tolerantes. En este estudio, se evaluó el efecto de la IFA con la combinación de luz roja con fluencia de 10 y 15 J cm⁻², y cinco FS fenotiazínicos, azul de metileno (MB), azul de toluidina O (TBO), nuevo azul de metileno N forma libre de zinc (NMBN), nuevo azul de metileno N sal de cloruro de zinc (NMBN Zn) y un nuevo fenotiazínico pentacíclico S137, en microconidia no germinadas y germinadas de *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme* y *F. solani*. La IFA con NMBN Zn resultó en una reducción de 5-log de supervivencia de microconidia sin germinar (en reposo) y microconidia germinadas (metabólicamente activas) de las tres especies de *Fusarium* cuando se aplicó la fluencia de luz de 15 J cm⁻². El lavado de microconidia germinadas y no germinadas, para eliminar el exceso de FS antes de la exposición a la luz reduce, pero no impidió la muerte causada por la IFA. La IFA con todo los FS y fluencias aumento la permeabilidad de la membrana celular de las tres especies de *Fusarium*. El daño oxidativo provocado por EROs producido durante el proceso fotoquímico de la IFA se evaluó en lípidos proteínas y DNA en microconidia de las tres especies de *Fusarium*. Se observó un aumento en la peroxidación de lípidos en las microconidia de las tres especies de *Fusarium*, después de la IFA con NMBN Zn y S137. Hemos observado el aumento de la carbonilación de las proteínas en microconidia de *F. oxysporum* después de la IFA subletal con todos los FS. El aumento de daño del DNA en microconidia no germinadas y germinadas se observó sólo para el S137 en fluencia de 0, 10 y 15 J cm⁻². Nuestro estudio amplía la comprensión de la inactivación fotodinâmica en hongos filamentosos.

Palabras-claves: Inactivación fotodinâmica antimicrobiana, Fotobiología de hongos, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema das principais reações dos fotoprocessos tipo I e tipo II, onde FS é o fotossensibilizador no estado fundamental singleto, $^3\text{FS}^*$ é o fotossensibilizador no estado excitado tripleto, FS^- é a molécula do fotossensibilizador reduzida, $^3\text{O}_2$ é o oxigênio no seu estado fundamental tripleto, O_2^- é o radical ânion superóxido, H_2O_2 é o peróxido de hidrogênio, Fe^{3+} e Fe^{2+} são íons de ferro, $\cdot\text{OH}$ é a hidroxila radicalar, OH^- é a hidroxila, e $^1\text{O}_2$ é o oxigênio singleto (modificado de MacDonald e Dougherty, 2001; Plaetzer <i>et al.</i> , 2009).....	3
Figura 2 -	Estrutura tricíclica base dos fotossensibilizadores fenotiazínicos.....	5
Figura 3 -	Estrutura química dos fotossensibilizadores fenotiazínicos usados no estudo.....	12
Figura 4 -	Espectro de absorção no visível dos fotossensibilizadores fenotiazínicos MB, TBO, NMBN, NMBN Zn e S137. Os espectros foram obtidos na concentração de 10 μM	12
Figura 5 -	Emissão espectral do arranjo de LED vermelho (eLED, CA, EUA) utilizado no estudo.....	13
Figura 6 -	Oxidação do 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) via reação com oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), formando o produto incolor 1,2 dibenzoilbenzeno.....	15
Figura 7 -	Espectro da absorvidade molar dos fotossensibilizadores fenotiazínicos, MB (A), TBO (B), NMBN (C), NMBN Zn (D) e S137 (E); e a Irradiância espectral efetiva do LED. Para o cálculo da absorvidade molar foi utilizado a formula $A = \varepsilon \times c \times l$. Os FS foram preparados em metanol na concentração de 10 μM , a absorbância foi feita em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico. A irradiância espectral efetiva foi calculada multiplicando a absorvidade molar pelo espectro de emissão do LED ($I_{ef} = Abs_m \times Em_{LED}$).....	26
Figura 8 -	Oxidação de DPBF mediada pelo oxigênio singleto produzido durante a foto-excitação dos fotossensibilizadores MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C), NMBN (D) e S137 (E). Solução de DPBF sem a presença de FS (F) irradiada em intervalos de 5 s foi utilizado como controle.....	28
Figura 9 -	Oxidação de DPBF mediada pelo oxigênio singleto produzido durante a foto-excitação dos fotossensibilizadores adicionando cloreto de zinco, MB ZnCl_2 (A), TBO ZnCl_2 (B), NMBN ZnCl_2 (C), e S137 ZnCl_2 (D). Solução de DPBF sem a presença de FS (E) irradiada em intervalos de 5 s foi utilizado como controle.....	29
Figura 10 -	Atividade metabólica de microconídios não germinados e 4 h-germinados de <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> e <i>F. solani</i> . A atividade metabólica dos microconídios foi avaliada pela conversão do fluoróforo FUN-1 (fluorescência verde) em estruturas cilíndricas intra-vacuolares (Cylindrical intra-vacuolar structures – CVIS, fluorescência vermelho). Cada valor é a média de 2 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....	30
Figura 11 -	Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de <i>F. oxysporum</i> com MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e lavados ou não lavados antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....	34
Figura 12 -	Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-	

- germinados de *F. moniliforme* com MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e lavados ou não lavados antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....35
- Figura 13 -** Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. solani* com MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e lavados ou não lavados antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....35
- Figura 14 -** Microscopia óptica e de fluorescência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. oxysporum*. A e I- campo claro; B e J- DAPI; C e K- FM4-64; D e J- imagem sobreposta com DAPI, FM4-64 e campo claro (software Leica Application Suite X); E e M- MB 100 µM; F e N- NMBN Zn 100 µM; G e O- TBO 100 µM; H e P- S137 100 µM. Antes da microscopia, o excesso de FS foi removido por lavagens. As setas indicam (P), vesículas formadas no interior do citoplasma de microconídios 4 h-germinados após o tratamento com S137. Barra de escalas, de 10 µm. A microscopia de fluorescência foi feita no aumento de 630 × e ampliação digital de 2 × em microscópio confocal Leica TCS SP8 e campo claro no aumento de 1000 × em microscópio Coleman N-120.....37
- Figura 15 -** Microscopia óptica e de fluorescência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. moniliforme*. A e I- campo claro; B e J- DAPI; C e K- FM4-64; D e J- imagem sobreposta com DAPI, FM4-64 e campo claro (software Leica Application Suite X); E e M- MB 100 µM; F e N- NMBN Zn 100 µM; G e O- TBO 100 µM; H e P- S137 100 µM. Antes da microscopia, o excesso de FS foi removido por lavagens. Barra de escalas, de 10 µm. A microscopia de fluorescência foi feita no aumento de 630 × e ampliação digital de 2 × em microscópio confocal Leica TCS SP8 e campo claro no aumento de 1000 × em microscópio Coleman N-120.....38
- Figura 16 -** Microscopia óptica e de fluorescência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. solani*. A e I- campo claro; B e J- DAPI; C e K- FM4-64; D e J- imagem sobreposta com DAPI, FM4-64 e campo claro (software Leica Application Suite X); E e M- MB 100 µM; F e N- NMBN Zn 100 µM; G e O- TBO 100 µM; H e P- S137 100 µM. Antes da microscopia, o excesso de FS foi removido por lavagens. As setas indicam (P), vesículas formadas no interior do citoplasma de microconídios 4 h-germinados após o tratamento com S137. Barra de escalas, de 10 µm. A microscopia de fluorescência foi feita no aumento de 630 × e ampliação digital de 2 × em microscópio confocal Leica TCS SP8 e campo claro no aumento de 1000 × em microscópio Coleman N-120.....39
- Figura 17 -** Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. oxysporum* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 4 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de manitol; (3) Adição de azida de sódio e (4) Adição de glutathione reduzida (glutathione), antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....42

- Figura 18 -** Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. moniliforme* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 4 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de manitol; (3) Adição de azida de sódio e (4) Adição de glutatona reduzida (glutatona), antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....43
- Figura 19 -** Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. solani* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 4 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de manitol; (3) Adição de azida de sódio e (4) Adição de glutatona reduzida (glutatona), antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....44
- Figura 20 -** Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. oxysporum* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN-Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 6 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de cloreto de zinco; (3) Adição de azida de sódio; (4) Adição de cloreto de zinco e azida de sódio; (5) Adição de EDTA e (6) Adição de EDTA e azida de sódio, antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....46
- Figura 21 -** Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. moniliforme* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 6 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de cloreto de zinco; (3) Adição de azida de sódio; (4) Adição de cloreto de zinco e azida de sódio; (5) Adição de EDTA e (6) Adição de EDTA e azida de sódio, antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....47
- Figura 22 -** Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. solani* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 6 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de cloreto de zinco; (3) Adição de azida de sódio; (4) Adição de cloreto de zinco e azida de sódio; (5) Adição de EDTA e (6) Adição de EDTA e azida de sódio, antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....48
- Figura 23 -** Porcentagem de microconídios corados com PI (coluna cinza) e fração de sobrevivência (quadrado preto) de *F. oxysporum* após a IFA com MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....50
- Figura 24 -** Porcentagem de microconídios corados com PI (coluna cinza) e fração de sobrevivência (quadrado preto) de *F. moniliforme* após a IFA com MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Cada valor é a média de 3 experimentos

	independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....	50
Figura 25 -	Porcentagem de microconídios corados com PI (coluna cinza) e fração de sobrevivência (quadrado preto) de <i>F. solani</i> após a IFA MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....	51
Figura 26 -	Peroxidação de lipídios de microconídios avaliados pela formação de malondialdeído (coluna cinza) e fração de sobrevivência (quadrado preto) após a IFA com MB, TBO, NMBN Zn e S137 de: (A) <i>F. oxysporum</i> , (B) <i>F. moniliforme</i> e (C) <i>F. solani</i> . Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....	52
Figura 27 -	Carbonilação de proteínas de microconídios não germinados de <i>F. oxysporum</i> , avaliados pela formação de grupos carbonilas de dinitrofenil (DNP) hidrazona (coluna cinza) e fração de sobrevivência (quadrado preto) após a IFA com MB, TBO, NMBN Zn e S137. Cada valor é a média de 2 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....	53
Figura 28 -	Fragmentação do núcleo de microconídios não germinados avaliados pela técnica de <i>Hypotonic fluorescent solution-HFS</i> (coluna cinza) e fração de sobrevivência (quadrado preto) após a IFA com MB, TBO, NMBN Zn e S137 de: (A) <i>F. oxysporum</i> , (B) <i>F. moniliforme</i> e (C) <i>F. solani</i> . Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....	55
Figura 29 -	Fragmentação do núcleo de microconídios 4 h-germinados avaliados pela técnica de <i>Hypotonic fluorescent solution-HFS</i> (coluna cinza) e fração de sobrevivência (quadrado preto) após a IFA com MB, TBO, NMBN Zn e S137 de: (A) <i>F. oxysporum</i> , (B) <i>F. moniliforme</i> e (C) <i>F. solani</i> . Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.....	56
Figura 30 -	Taxa de sobreviventes de larvas de <i>G. mellonella</i> após infecção com diferentes concentrações de microconídios (2×10^8 , 2×10^7 , 2×10^6 , 2×10^5 e 2×10^4 células mL ⁻¹) de <i>F. oxysporum</i> (A), <i>F. moniliforme</i> (B), <i>F. solani</i> (C). Inoculação de larvas com tampão PBS foi usada como controle de sobrevivência.....	57
Figura 31 -	Efeito da IFA com os FS MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F) e S137 (G e H) em larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>F. moniliforme</i> . Inoculação de larvas com tampão PBS foi usada como controle de sobrevivência.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Propriedades fotofísicas dos fotossensibilizadores fenotiazínicos. As propriedades fotofísicas foram determinadas em metanol.....	25
Tabela 2 –	Rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_{Δ}) dos fotossensibilizadores fenotiazínicos. As soluções dos FS foram preparadas em metanol e o MB foi utilizado como padrão para o cálculo do ϕ_{Δ}	27
Tabela 3 –	Rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_{Δ}) dos fotossensibilizadores fenotiazínicos na presença de cloreto de zinco. As soluções dos FS e cloreto de zinco foram preparados em metanol e o MB foi utilizado como padrão para o cálculo do ϕ_{Δ}	29
Tabela 4 –	Concentração inibitória mínima (μM) da IFA com os fotossensibilizadores fenotiazínicos MB, TBO, NMBN e S137 em <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> e <i>F. solani</i> . Os resultados da CIM são expressos como intervalos observados em três experimentos independentes.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
×	Vezes
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
μmol	Micromol
μs	Microsegundos
·OH ⁻	Hidroxila radicalar
·SO ₄ ⁻	Radical ânion sulfato
¹ O ₂	Oxigênio singlete
³ O ₂	Oxigênio molecular no seu estado fundamental tripleto
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Al ³⁺	Íon Alumínio
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
ATCC [®]	American type culture collection
ATP	Adenosina trifosfato
AU	Ácido úrico
BHT	3,5-di-tert-4-butylhydroxytoluene
<i>c</i>	Concentração molar
CCCP	2-[2-(3-Chlorophenyl)hydrazinylydene]propanedinitrile
CIM	Concentração inibitória mínima
cm	Centímetro
Co ²⁺	Íon Cobalto (II)
Cu ²⁺	Íon Cobre (II)
CVIS	Cylindrical intra-vacuolar structures
Cys	Cisteína
DAPI	Fluorocromo 4',6-diamidino-2phenylindole
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4 dinitrofenilhidarzina
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da America
Fe ²⁺	Íon Ferro (II)
Fe ³⁺	Íon Ferro (III)
FM4-64 [®]	Fluorocromo lipofílico comercial
FS	Fotossensibilizador
FUN-1	Fluorocromo comercial

g	Gravidade
g	Grama
Ga^{3+}	Íon Gálio
GSH	Glutathione reduzida
h	Hora
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HFS	Solução hipotônica fluorescente
His	Histidina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSO_4^-	Hidrogenossulfato/Bisulfato
I_{abs}	Taxa de absorção de luz do fotossensibilizador
I_{abs}^{std}	Taxa de absorção de luz do padrão
I_{ef}	Irradiância efetiva
IF	Inativação fotodinâmica
IFA	Inativação fotodinâmica antimicrobiana
INCQS	Instituto nacional de controle de qualidade em saúde
J	Joules
l	Caminho ótico
L	Litro
LED	Light emitting diode
Leu	Leucina
log	Logaritmo
Lys	Lisina
M	Molar
m	Metro
m/v	Relação massa, volume
MB	Azul de metileno
MDA	Malondialdeído
Met	Metionina
min	Minuto
mL	Mililitros
nm	Nanômetro
NMBN	Novo azul de metileno fórmula sem zinco
NMBN Zn	Novo azul de metileno fórmula com zinco
NO^-	Oxido nítrico
$O_2^- \cdot$	Radical ânion superóxido
$^{\circ}C$	Grau Celsius
$ONOO^-$	Peroxinitrito
PBS	Salina tamponada com fosfato (Phosphate buffered saline)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDA	Potato Dextrose Agar
pH	Potencial de hidrogênio iônico
PI	Iodeto de propídio

R	Taxa de fragmentação do fotossensibilizador
RNA	Ácido ribonucleico
RNO	p-nitrosodimetilanilina
rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640
R^{std}	Taxa de fragmentação do padrão
s	Segundos
S_0	Estado fundamental
S_1	Estado excitado singleto
S137	Derivado não comercial do azul de metileno
SOD	Superóxido dismutase
T_1	Estado excitado tripleto
TBO	Azul de toluidina O
TCA	Ácido tricloroacético
Trip	Triptofano
Tyr	Tirosina
TM	Trade Mark
UFC	Unidade formadora de colônia
UK	United Kingdom
v/v	Relação volume, volume
Val	Valina
W	Watts
Zn^{2+}	Íon Zinco
ε	Absortividade molar
λ	Comprimento de onda
ϕ_{Δ}	Rendimento quântico de oxigênio singleto
$\phi_{\Delta}^{\text{std}}$	Rendimento quântico de oxigênio singleto padrão

1. Introdução

O aumento da tolerância aos antifúngicos comerciais observado em diversos gêneros de fungos patogênicos e o aumento do número de indivíduos acometidos por micoses representam um sério problema de saúde pública (Pereiro Jr. *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2010). A seleção de linhagens tolerantes não está restrita apenas a gêneros e espécies de fungos que apresentam interesse médico; o surgimento de linhagens tolerantes aos fungicidas convencionais também tem sido observado em diversas espécies de fungos fitopatogênicos (De Menezes *et al.*, 2014a,b). O número de indivíduos acometidos por micoses aumentou muito nas últimas décadas devido ao crescente número de imunocomprometidos em decorrência da AIDS e do uso de medicamentos imunossupressores (Kim e Sudbery, 2011). Mesmo em indivíduos imunocompetentes, alguns tipos de micoses, particularmente as causadas por dermatófitos, requerem tratamentos prolongados (Gupta e Cooper, 2008). O uso prolongado de fungicidas faz com que a seleção de linhagens tolerantes seja inevitável. Adicionalmente, a utilização inapropriada, como a interrupção do tratamento e o uso de fungicidas como conservantes, em uma extensa gama de produtos atuam conjuntamente para acentuar o problema. Os tratamentos prolongados com fungicidas sistêmicos também aumentam a chance de ocorrerem efeitos colaterais devido à toxicidade do fungicida para o hospedeiro e de interações medicamentosas (Nunley e Cornelius, 2008). O problema se agrava pelo número relativamente pequeno de antimicóticos disponíveis. Nesse cenário, é extremamente desejável o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de micoses que sejam eficazes, baratas, pouco tóxicas para o hospedeiro e que possam ser utilizadas repetidas vezes, sem o risco da seleção de linhagens tolerantes. Para o tratamento de micoses superficiais, a exploração da inativação fotodinâmica (IF) é uma alternativa interessante à quimioterapia convencional (Dai *et al.*, 2012; St. Denis *et al.*, 2011; Vera *et al.*, 2012).

1.1. Princípios gerais da inativação fotodinâmica

A partir da descoberta da inativação fotodinâmica em 1900 por Oscar Raab, o tratamento fotodinâmico foi desenvolvido principalmente para a terapia do câncer e de algumas doenças dermatológicas e oftalmológicas (Dai *et al.*, 2012). Durante a década de oitenta, o interesse pelo efeito antimicrobiano do tratamento fotodinâmico em infecções localizadas foi retomado (Wainwright, 2014). O princípio da inativação fotodinâmica antimicrobiana (IFA) é simples, baseia-se na combinação de três elementos: o fotossensibilizador (FS), capaz de se acumular seletivamente ou ser preferencialmente metabolizado pelas células-alvo; a luz com comprimentos de onda adequados, capaz de ativar

o FS; e o oxigênio molecular. A ativação do FS na presença do oxigênio leva à produção de espécies reativas do oxigênio (EROs), como a hidroxila radicalar e o oxigênio singlete, capazes de matar ou inativar as células-alvo (Oliveira, Machado e Pessine, 2005). Dependendo do FS utilizado, a ativação pode ser obtida por meio de exposições à luz branca policromática ou com radiações monocromáticas (Kochevar *et al.*, 1996).

Após absorver um fóton, a molécula do FS passa do estado fundamental (S_0) para o estado excitado singlete (S_1). O FS pode perder sua energia de excitação por vários processos radiativos (fluorescência e fosforescência) ou não radiativos (interconversão e cruzamento inter-sistemas). Por meio do processo de cruzamento inter-sistemas, a molécula do FS passa do estado S_1 para o estado excitado tripleto (T_1), caracterizado pelo tempo de vida muito maior do que o estado S_1 . O estado tripleto pode reagir por meio de dois processos, conhecidos por fotoprocessos do Tipo I e do Tipo II, que requerem oxigênio molecular para que ocorram as reações (Hamblin *et al.*, 2002, Donnelly, McCarron e Tunney, 2008).

O fotoprocesso do Tipo I (**Figura 1**) envolve frequentemente a produção inicial do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), por transferência de elétrons do T_1 do FS para o oxigênio molecular (Bilski *et al.*, 1993; Ma e Jiang, 2001). O $O_2^{\cdot-}$ não é por si só reativo e não causa muito dano oxidativo, mas pode reagir por meio de uma reação conhecida como “desmutação”, catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. O H_2O_2 é muito importante nos sistemas biológicos e as células não são capazes de excluí-lo. Além disso, pode atravessar facilmente as membranas celulares, facilitando o trânsito da molécula na célula. O H_2O_2 é necessário para ativar muitas enzimas celulares, sendo muito importante para o metabolismo celular. Porém, o excesso de H_2O_2 pode levar a célula à morte, por consequência de dano oxidativo em várias biomoléculas (Sharman, Allen e van Lier, 2000; Bergamini *et al.*, 2004; Plaetzer *et al.*, 2009). Além da importância na produção de H_2O_2 , o $O_2^{\cdot-}$ também é importante para a produção da hidroxila radicalar ($\cdot OH$). Nesse processo, o $O_2^{\cdot-}$ atua efetivamente como um agente redutor, não como um agente oxidante. Isto ocorre porque o superóxido doa um elétron para reduzir íons metálicos como Fe^{3+} , que atua como catalisador na conversão de H_2O_2 em $\cdot OH$. Essa reação é chamada de “Fenton”, e foi descoberta há mais de cem anos. Ela é importante em sistemas biológicos porque a maioria das células possui algum nível de metais como o ferro e o cobre, o que pode facilitar a catalisação desta reação (Halliwell, 1984a,b; Halliwell e Gutteridge, 1984; Plaetzer *et al.*, 2009). O $O_2^{\cdot-}$ também reage diretamente com H_2O_2 , para a formação da $\cdot OH$, reação denominada “Heber Weiss” (Bergamini *et al.*, 2004). A $\cdot OH$ é altamente reativa

em sistemas biológicos, podendo oxidar qualquer molécula presente na célula. A $\cdot\text{OH}^-$ também pode se difundir facilmente através de membranas, semelhante ao H_2O_2 e seu dano não está restrito ao compartimento celular onde foi produzida (Halliwell, 1984a; Bergamini *et al.*, 2004). Outras reações que o $\text{O}_2^{\cdot-}$ participa, porém com menos frequência, são a reação com a $\cdot\text{OH}^-$ resultando na formação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e a reação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ com o radical oxido nítrico ($\text{NO}^\cdot$) para a produção de peroxinitrito (ONOO^-), outra molécula que possui uma alta capacidade oxidante (Castro, Demidova e Hamblin, 2005).

A transferência de energia do FS diretamente para o oxigênio molecular é chamado de fotoproceto do Tipo II (**Figura 1**). A transferência de energia do estado excitado tripleto do FS para o oxigênio molecular em seu nível basal de energia ($^3\text{O}_2$), produz o oxigênio no estado excitado, denominado oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que é capaz de oxidar diversas biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, levando a célula à morte (Hamblin *et al.*, 2002, Donnelly, McCarron e Tunney, 2008).

Figura 1 – Esquema das principais reações dos fotoprocessos tipo I e tipo II, onde FS é o fotossensibilizador no estado fundamental singlete, $^3\text{FS}^*$ é o fotossensibilizador no estado excitado tripleto, $\text{FS}^{\cdot-}$ é a molécula do fotossensibilizador reduzida, $^3\text{O}_2$ é o oxigênio no seu estado fundamental tripleto, $\text{O}_2^{\cdot-}$ é o radical ânion superóxido, H_2O_2 é o peróxido de hidrogênio, Fe^{3+} e Fe^{2+} são íons de ferro, $\cdot\text{OH}^-$ é a hidroxila radicalar, OH^- é a hidroxila, e $^1\text{O}_2$ é o oxigênio singlete (modificado de MacDonald e Dougherty, 2001; Plaetzer *et al.*, 2009).

Ao contrário das formas reativas de oxigênio radicalares, que são produzidas por reações enzimáticas durante o metabolismo celular, e contra as quais existem diversos sistemas de defesa, o $^1\text{O}_2$ não é um componente do metabolismo e as células normalmente não

o toleram, tendo um papel importante no processo fotodinâmico (Daub e Ehrensharft, 2000; St. Denis *et al.*, 2011). Os danos causados pelo $^1\text{O}_2$ ocorrem em moléculas e estruturas celulares que estão próximas ao FS, pois essa espécie reativa de oxigênio tem uma meia vida curta (10^{-4} a 10^{-8} s) e sua difusão é muito limitada (< 200 nm) (Smijs *et al.*, 2008).

Ambos os fotoprocessos (tipo I e tipo II) ocorrem de forma simultânea durante a IFA e a relação entre estes processos depende do tipo de FS utilizado, das concentrações do substrato e do oxigênio molecular (Castro, Demidova e Hamblin, 2005). Porém, para a maioria dos FS utilizados na IFA, a reação fotoquímica do tipo II representa o processo mais importante (Weishaupt, Gomer e Dougherty, 1976; Ito, 1978; Valenzo, 1987; Plaetzer *et al.*, 2009). O uso de agentes antioxidantes pode auxiliar a avaliar qual tipo de fotoprocesso é predominante durante a IFA. Os principais antioxidantes utilizados nessa avaliação são: 4,5 dihidroxi-1,3-ácido benzenodissulfônico sal dissódico hidratado, como sequestrante de $\text{O}_2^{\cdot-}$; piruvato de sódio, como sequestrante de H_2O_2 ; D-manitol, como sequestrante de $\cdot\text{OH}$; 5,10,15,20-tetraquis-(4-sulfonato fenil)-porfirinato cloreto de ferro (III), como sequestrante de ONOO^- ; Azida de sódio, como sequestrante de $^1\text{O}_2$; e glutatona reduzida (GSH) um antioxidante natural, que atua inespecificamente erradicando por completo todo tipo de EROs e auxiliando na confirmação de que os danos observados são provenientes das EROs produzidas durante a IFA (Baltazar *et al.*, 2013; Monea *et al.*, 2014; Baltazar *et al.*, 2015).

O modo de ação do tratamento fotodinâmico que ocorre por meio da oxidação inespecífica de diversos alvos celulares, dificulta muito a seleção de microrganismos tolerantes, embora a tolerância intrínseca das diferentes espécies e/ou estruturas ao tratamento fotodinâmico possa variar muito (de Souza *et al.*, 2006; Giuliani *et al.*, 2010 Vera *et al.*, 2012). A ausência de seleção de linhagens tolerantes, a baixa toxicidade ao hospedeiro e a capacidade de matar estruturas quiescentes (conídios, microconídios, etc.) e metabolicamente ativas (leveduras, hifas) são as principais vantagens do tratamento fotodinâmico antifúngico em relação aos fungicidas convencionais (Smijs *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2013).

1.2. Fotossensibilizadores

Os FS são compostos atóxicos ou pouco tóxicos, inativos em seu estado fundamental e quando iluminados, preferencialmente na região da radiação visível, não devem ser genotóxicos ou mutagênicos (Dougherty, 1993). Diversos FS, a maioria dos quais pertencentes a quatro grupos químicos (corantes fenotiazínicos, clorinas, porfirinas e ftalocianinas), têm sido utilizados na IF (Smijs e Pavel, 2011; Calzavara-Pinton *et al.*, 2012). Os fenotiazínicos têm sido utilizados com sucesso no tratamento de micoses orais causadas

por *Candida albicans* (Wainwright, 1996; Wainwright, 1998; Wilson e Mia, 1993; Demidova e Hamblin, 2005; Donnelly *et al.*, 2007; Prates *et al.*, 2011; Dai; *et al.*, 2012) e na inativação de conídios de fungos filamentosos (Gonzales *et al.*, 2010; De Menezes *et al.*, 2014b). Os FS fenotiazínicos possuem estruturas tricíclicas simples e planas, normalmente catiônicas, como é mostrado na **figura 2**. Dentre os fenotiazínicos utilizados para a IF de fungos estão o azul de metileno (MB), azul de toluidina O (TBO), o novo azul de metileno (NMBN Zn) e o derivado não comercial do MB 1,11-Diethyl-2,2,4,8,10,10-hexamethyl-1,2,3,4,8,9,10,11-octahydrodipyrído [3,2-b:2',3'-i] phenothiazinium hydrogensulphate (S137) (De Menezes *et al.*, 2014). São moléculas que têm uma boa eficiência na produção de EROs e têm absorção máxima entre 620 a 680 nm (Donnelly; McCarron; Tunney, 2008; De Menezes *et al.*, 2014b). O MB e TBO são FS clinicamente aprovados para uso em humanos e atuam eficientemente contra microrganismos tendo como principal alvo a membrana de fungos (Plaetzer *et al.*, 2009; Calzavara-Pinton *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2012).

Figura 2 – Estrutura tricíclica base dos fotossensibilizadores fenotiazínicos

Propriedades físico-químicas dos FS, como carga, lipo e hidrossolubilidade são muito importantes para a eficácia da fotossensibilização (Fuchs *et al.*, 2007). Para melhorar a eficiência da IFA, as moléculas dos FS devem ter algumas características fundamentais (FS ideal): alto coeficiente de absorvidade molar na janela terapêutica (600 – 800 nm); especificidade pela célula-alvo; curto intervalo de tempo entre a aplicação do FS e a sua máxima captação pelas células-alvo; rápida eliminação do FS pelas células não-alvo; ser preferencialmente solúvel em meio aquoso; devem ter pequena toxicidade no escuro; e alta capacidade de produção de $^1\text{O}_2$ (Henderson e Dougherty, 1992; Detty, Gibson e Wagner, 2004; Castro, Demidova e Hamblin, 2005).

Alterações nas estruturas dos FS podem aumentar a eficiência da produção do $^1\text{O}_2$ e alterar o pico de absorção máxima da molécula (Wainwright e McLean, 2016). Nos FS fenotiazínicos a substituição de carbonos da estrutura tricíclica por bromo e iodo aumentam a eficiência de produção do $^1\text{O}_2$, bem como a fusão de anéis benzeno na estrutura tricíclica, altera o pico de absorção máxima de FS fenotiazínicos, porém diminui a produção do $^1\text{O}_2$.

(Wainwright e McLean, 2016). A presença de íons metálicos na estrutura do FS influencia fortemente suas propriedades fotofísicas (Josefsen e Boyle, 2008). FS do grupo das ftalocianinas, que apresentam metais como zinco e alumínio em sua formação, demonstram ser mais eficientes na produção do oxigênio singlete. Entretanto, porfirinas que possuem cobre (Cu^{2+}), cobalto (Co^{2+}), ferro (Fe^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) em suas formulações são todos fotoativos, em comparação com as porfirinas sem metal (Ali e van Lier, 1999; Josefsen e Boyle, 2008). Entre os FS fenotiazínicos, o NMBN possui duas formulações, uma sem a presença de metais e outra com o zinco na sua formulação (Kasimova *et al.*, 2014; De Menezes *et al.*, 2014b).

1.3. Fontes de luz utilizadas na inativação fotodinâmica

Os lasers e os arranjos de LED (*light-emitting diode*) estão entre as fontes de luz mais utilizadas na IF, tanto *in vitro*, como *in vivo*. A escolha do comprimento de onda utilizado nas exposições depende das características espectrais do FS. O comprimento de onda utilizado para a ativação do FS corresponde ou aproxima-se muito da sua máxima absorção. Os FS fenotiazínicos apresentam absorção máxima na região do vermelho (por exemplo: o MB tem pico de absorção em 665 nm), que está na janela terapêutica desejável. Essa região espectral é ideal para a IFA, pois as biomoléculas apresentam absorção mínima nessa região espectral, permitindo uma penetração mais profunda da luz nos tecidos humanos (De Paula *et al.*, 2010; De Menezes *et al.*, 2014b).

1.4. Inativação fotodinâmica de fungos

Embora muitos detalhes moleculares da IF de fungos continuem desconhecidos, diversos estudos estão sendo conduzidos visando a melhor compreensão do processo nas diferentes espécies e/ou estruturas fúngicas. Devido à grande importância clínica e por causarem micoses superficiais passíveis de serem tratadas pela IF, as espécies de *Candida* e de *Trichophyton* têm sido as mais estudadas (Munin *et al.*, 2007; Junqueira *et al.*, 2009; Smijs e Pavel, 2011; Dovigo *et al.*, 2011; Gonzales e Maisch, 2012). A IF também foi capaz de matar *C. albicans* em biofilme e de fotoinativar outras estruturas do desenvolvimento do fungo, como o tubo germinativo (Chabrier-Roselló *et al.*, 2005). Os efeitos da IF também foram descritos em outras espécies de fungos patogênicos, como *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus* spp., *Paracoccidioides* spp. e em fungos-modelo, como *A. nidulans* e *Metarhizium anisopliae* (Gonzales *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2012). Um dos primeiros aspectos investigados é o tipo de interação entre a célula fúngica e o FS. Três tipos diferentes de interação já foram descritos. Existem FS que entram na célula microbiana, outros que se ligam à superfície celular, mas não penetram na célula, e outros que não se ligam e não

penetram na célula (Demidova e Hamblin, 2005; Gonzales *et al.*, 2010; De Menezes *et al.*, 2014a,b).

O tipo de interação pode alterar-se em função das condições do meio, das características da célula, da estrutura do FS e do transcorrer do processo fotodinâmico. A determinação do tipo de interação é importante, não apenas para a compreensão dos mecanismos que envolvem o processo fotodinâmico, mas também para a escolha das formulações e/ou estratégias terapêuticas mais apropriadas. As características físico-químicas da superfície celular influenciam a seletividade e eficácia dos diferentes FS (Usacheva *et al.*, 2001; Fuchs *et al.*, 2007; Gonzales *et al.*, 2010). A membrana plasmática e a parede celular dos fungos são carregadas negativamente, favorecendo a ligação de FS catiônicos, como os corantes fenotiazínicos. O TBO liga-se instantaneamente a polifosfatos localizados na superfície externa da membrana plasmática da levedura *Saccharomyces fragilis* (Tijssen *et al.*, 1981). Ito (1977) observou que o TBO não penetra na célula de *S. cerevisiae* e toda atividade fotodinâmica do FS foi atribuída a sua ação iniciada no meio extracelular. Durante a fotossensibilização de conídios de *A. nidulans*, os FS MB e TBO não se ligam à superfície e nem penetram na célula. Nesses casos, a inativação dos conídios é decorrente da produção de EROs no meio extracelular e é inibida quando as células são lavadas antes de serem expostas à luz (Gonzales *et al.*, 2010).

Alguns FS ligam-se à superfície externa da célula, mas não penetram no seu interior, a menos que a parede celular e/ou a membrana seja danificada, o que pode ocorrer ao longo da IF. Smijs e colaboradores (2008) relataram severas deformidades e ruptura da parede celular, tanto em microconídios, como em micélio de *T. rubrum* após a IF com o FS catiônico Sylsens B. Existem casos em que o FS penetra rapidamente na célula microbiana. Quando isso ocorre, ele pode distribuir-se pelo citoplasma ou acumular-se preferencialmente em estruturas subcelulares, que serão preferencialmente danificadas durante a IF (De Menezes *et al.*, 2014a,b). O FS também pode ser eliminado pela célula por meio de mecanismos ativos de transporte (Prates *et al.*, 2011; Daí *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, intensificaram-se os esforços para a identificação dos efeitos moleculares da IF em fungos e os mecanismos envolvidos na morte celular. A microscopia confocal tem sido utilizada para determinar a captação e a localização intracelular de FS (So *et al.*, 2010, Rodrigues *et al.*, 2013). Tanto a microscopia eletrônica de transmissão quanto a de varredura foram utilizadas para determinar os danos da IF no núcleo e na parede celular, respectivamente (So *et al.*, 2010; Oriel e Nitzan, 2012; Smijs *et al.*, 2008). Análises por citometria de fluxo foram utilizadas para avaliar danos na membrana, no material genético e

para avaliar o estresse oxidativo induzido pela IF (So *et al.*, 2010). A PCR em tempo real tem sido utilizada para avaliar alterações na transcrição gênica em resposta a IF (Almeida *et al.*, 2012). Respostas celulares a IF, como a apoptose, têm sido descritas e investigadas em *C. albicans* (Lam *et al.*, 2011).

Os efeitos da IF foram estudados majoritariamente em células metabolicamente ativas. Pouco se sabe a respeito do mecanismo de ação e dos efeitos moleculares da IF em estruturas fúngicas quiescentes, como conídios e esporos, que estão envolvidas no reconhecimento e infecção do hospedeiro (Barros *et al.*, 2010). Conídios e esporos diferem de células metabolicamente ativas em características bioquímicas (*e.g.* composição química das diferentes estruturas), fisiológicas (*e.g.* taxa metabólica, resposta ao estresse e expressão de mecanismos de adaptação e defesa) e estruturais (*e.g.* organização de estruturas intracelulares e espessura de parede) que podem influenciar o processo fotodinâmico (Gonzales *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2010).

1.5. Sistema biológico

As espécies do gênero *Fusarium* pertencem ao filo Ascomycota, classe dos Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Nectriaceae. São fungos hialinos, saprófitas, em sua maioria fitopatogênicos, mas podendo ser patógeno oportunista em humanos. As espécies de *Fusarium* apresentam ampla distribuição geográfica e podem ser isoladas de uma grande variedade de substratos, como solo, restos de plantas e água (Nelson, Dignani e Anaissie, 1994; Nucci, *et al.*, 2004). O gênero *Fusarium* reproduz-se assexuadamente por meio de três tipos de esporos, denominados macroconídios, microconídios e clamidósporos. Estas estruturas estão envolvidas na dispersão e persistência ambiental, e também no reconhecimento e na infecção do hospedeiro (Wickern, 1993; Nelson, Dignani e Anaissie, 1994; Nucci *et al.*, 2004).

As maiores incidências de fusariose estão limitadas a micoses superficiais (queratites e onicomicoses), porém, a partir dos anos 80, houve um aumento de infecções invasivas e disseminadas causadas por espécies de *Fusarium*. Os principais pacientes acometidos são aqueles portadores de doenças que deprimem o sistema imunológico, nos quais as taxas de mortalidade são superiores a 75% (Rabodonirina, *et al.*, 1994; Boutati e Anaissie, 1997; Guarro e Gené, 1995; Rekha, Kindo e Ravi, 2008; Nunes *et al.*, 2010). As espécies de *Fusarium* que têm sido frequentemente relatadas como agentes etiológicos de infecções oportunistas em humanos são: *Fusarium solani*, *F. oxysporum* e *F. moniliforme* (Martino *et al.*, 1994; Bushelman *et al.*, 1995; Boutati e Anaissie, 1997).

A patogenia das infecções causadas por espécies de *Fusarium* é um processo pouco estudado, ainda assim, alguns pesquisadores consideram a pele após trauma a principal via de infecção. Alguns relatos têm sido feitos de infecções associadas a uso de cateteres e a problemas gastrointestinais (Gamis, *et al.*, 1991; Rabodonirina, *et al.*, 1994; Boutati e Anaissie, 1997). Além da suscetibilidade do hospedeiro, as espécies de *Fusarium* possuem vários mecanismos moleculares e celulares que conferem diferentes níveis de virulência. Alguns fatores de virulência associados às espécies de *Fusarium*, como a produção de toxinas e enzimas capazes de lesionar o tecido do hospedeiro e a aderência a materiais prostéticos por meio da formação de biofilmes, contribuem para o desenvolvimento de infecções causadas por espécies de *Fusarium* (Nelson, Dignani e Anaissie, 1994).

O uso de medicamentos imunossupressores e o aumento do número de pessoas acometidas com o vírus HIV nas últimas décadas têm facilitado às infecções causadas por fungos oportunistas, necessitando de longos períodos de tratamentos com antifúngicos, que podem estender-se por toda a vida (Kim e Sudbery, 2011; Gupta e Cooper, 2008). O uso prolongado de fungicidas faz com que a seleção de linhagens tolerantes seja inevitável. A má adesão ao tratamento pelo paciente e/ou sua interrupção atuam conjuntamente para acentuar o problema (Nunley e Cornelius, 2008).

As espécies de *Fusarium* são resistentes à maioria de antifúngicos usados para o tratamento de infecções fúngicas em humanos. Entre elas, *F. solani* é considerada a mais resistente. No tratamento das fusarioses, altas doses de anfotericina B são inicialmente utilizadas. Combinações de anfotericina B e voriconazol ou com terbinafina, também são utilizadas com frequência (Godoy *et al.*, 2004; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2010; Inano *et al.*, 2013). Onicomioses causadas por *Fusarium* spp. são muito difíceis de tratar. O uso de antifúngicos sistêmicos não é eficaz na maioria dos casos, e a combinação do tratamento sistêmico e tópico cura apenas um terço dos pacientes. A maioria dos casos de onicomiose causada por *Fusarium* spp. não melhora mesmo após tratamentos prolongados, aumentando os riscos de seleção de linhagens mais tolerantes aos antifúngicos convencionais (Tosti *et al.*, 2003). Assim, a IFA surge como uma alternativa interessante à quimioterapia convencional para o tratamento de micoses superficiais, podendo ser utilizada repetidas vezes, com baixo risco de seleção de linhagens tolerantes (Dai *et al.*, 2012; St. Denis *et al.*, 2011; Vera *et al.*, 2012).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar os mecanismos envolvidos na inativação fotodinâmica com fotossensibilizadores fentotiazínicos em microconídios não germinado e 4 h-germinado dos fungos *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar as propriedades fotoquímicas e fotofísicas dos FS fenotiazínicos nas condições experimentais estudadas.
- Determinar a influência de parâmetros como: (1) tipo do FS, (2) concentração do FS, (3) tipo da fonte de luz e (4) dose de luz na eficácia da inativação fotodinâmica dos microconídios não germinado e 4 h-germinado.
- Avaliar a eficácia da IFA com os FS fenotiazínicos para matar os microconídios não germinado e 4 h-germinado.
- Estudar as interações entre os diferentes FS em estruturas especializadas das diferentes espécies e determinar a localização intracelular dos FS.
- Determinar os efeitos da IFA com os diferentes FS na integridade da parede celular e membrana plasmática; na integridade do núcleo e do material genético.
- Determinar o efeito da IFA em lipídios e proteínas presentes nos microconídios.

3. Materiais e métodos

3.1. Espécies utilizadas e condições de crescimento

Os experimentos foram realizados com as linhagens *Fusarium oxysporum* INCQS 40144 (ATCC®48112™), *Fusarium moniliforme* INCQS 40151 (ATCC®38159™) e *Fusarium solani* INCQS 40099 (ATCC®36031™), obtidos da “American Type Culture Collection (ATCC®)” (Manassas, VA, EUA). As espécies de *Fusarium* foram inoculadas em 25 mL de meio “Potato Dextrose Agar” (PDA) (Becton, Dickinson Company, EUA), e incubadas no escuro, a 28°C, por 5 dias. Os microconídios foram removidos e suspensos em tampão PBS (phosphate buffered saline), pH 7,4 esterilizado. As suspensões de microconídios foram filtradas por meio de membrana de polycarbonato com poros de 8 µm (Nucleopore, NJ, EUA) para a retirada de fragmentos de micélios. A concentração da suspensão de microconídios foi determinada por contagens em hematímetro, e ajustadas para as concentrações desejadas em unidade formadora de colônia (UFC) por mililitros.

3.2. Fotossensibilizadores

Os experimentos foram realizados com os fotossensibilizadores (FS) fenotiazínicos: (1) azul de metileno (methylene blue, MB) (C₁₆H₁₈ClN₃S) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA); (2) azul de toluidina O (toluidine blue O, TBO) (C₁₅H₁₆ClN₃S) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA); (3) novo azul de metileno N fórmula sem zinco (new methylene blue N zinc free form, NMBN) (C₁₈H₂₂ClN₃S) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA); (4) novo azul de metileno N fórmula com zinco (new methylene blue N zinc choride double salt, NMBN Zn) (C₁₈H₂₂ClN₃S × 0,5 ZnCl₂) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA); (5) um novo derivado não comercial do MB 1,11-diethyl-2,2,4,8,10,10-hexamethyl-1,2,3,4,8,9,10,11-octahydrodipyrido [3,2-b:2',3'-i] phenothiazinium hydrogensulphate denominado S137 (C₂₈H₃₉O₄N₃S₂) (Wainwright *et al.*, 2005). O FS S137 foi sintetizado e gentilmente cedido pelo Dr. Mark Wainwright, da Liverpool John Moores University, UK. As fórmulas estruturais de todas as moléculas são mostradas na **Figura 3**. Os espectros de absorção dos FS são mostrados na **Figura 4**. As soluções-estoque de todos FS foram preparadas em salina tamponada com tampão fosfato - PBS, pH 7,4, com concentrações dez vezes maiores (2000 µM) do que a maior concentração utilizada. As soluções foram aliquotadas e mantidas no escuro, a -18°C, por até seis meses.

Figura 3 – Estrutura química dos fotossensibilizadores fenotiazínicos usados no estudo.

Figura 4 – Espectro de absorção no visível dos fotossensibilizadores fenotiazínicos MB, TBO, NMBN, NMBN Zn e S137. Os espectros foram obtidos na concentração de 10 μM .

3.3. Sistema de iluminação

Para a ativação dos FS foi utilizado um arranjo de 96 “light emitting diode” (LED) vermelhos (eLED, CA, EUA), com emissão entre 600 e 650 nm (pico em 635 nm) e irradiância de $9,8 \text{ mW cm}^{-2}$. As fluências de luz utilizadas foram 5, 10, 15 e 20 J cm^{-2} correspondentes aos tempos de exposição ao arranjo de 96 LED de 6,5, 13, 19,5 e 26 min. A determinação do espectro de emissão dos LED e a determinação das irradiância (em mW cm^{-2}), na faixa espectral de interesse, foram feitas com o auxílio de um espectroradiômetro modelo USB 4000 (Ocean Optics Inc. FL, EUA), como descrito anteriormente (De Menezes *et al.*, 2014b). As leituras foram feitas pelo Prof. Dr. Luciano Bachmann do Departamento de Física e Matemática da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP (FFCLRP-USP). A **Figura 5** mostra o espectro de emissão do arranjo de LED utilizado neste estudo.

Figura 5 – Emissão espectral do arranjo de LED vermelho (eLED, CA, EUA) utilizado no estudo.

3.4. Determinação da absortividade molar dos fotossensibilizadores fenotiazínicos e irradiância espectral efetiva do LED

A absortividade molar (ε) dos FS fenotiazínicos foi determinada através da concentração dos FS *versus* absorbância, utilizando a lei de Lambert-Beer. Foram preparadas soluções dos FS, em metanol, na concentração de 10 μM . O espectro de UV-vis para cada FS foi determinado em cubeta de quartzo, com caminho ótico de 1 cm, utilizando o espectrofotômetro NanoPhotometer P-Class (IMPLEN GmbH, Munich, Alemanha). A ε foi determinada através da equação $A = \varepsilon \times c \times l$ (lei de Lambert-Beer), onde A é a absorção, ε é a absortividade molar, c é a concentração molar do FS e l é o caminho ótico. A irradiância espectral efetiva foi determinada através da multiplicação da absortividade molar de cada FS pelo espectro de emissão do LED utilizado no estudo. Os dados foram analisados utilizando o programa *OringinPro 8.0*.

3.5. Cálculo do rendimento quântico de oxigênio singlete (ϕ_{Δ}) dos fotossensibilizadores fenotiazínicos

A geração de oxigênio singlete pode ser caracterizada por método direto ou indireto. No método direto, a formação de oxigênio singlete é acompanhada pela emissão de fosforescência em 1270 nm (pico característico do oxigênio singlete) em função do tempo (Wilkinson, Helman e Ross, 1995). O método direto é altamente eficiente, entretanto é um sistema sofisticado e financeiramente inviável dificultando a execução desta técnica. No método indireto, é utilizada uma sonda química que atua como sequestrador químico de oxigênio singlete. Os sequestradores químicos usuais são o 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF), o p-nitrosodimetilanilina (RNO) e o ácido úrico (AU) (Fischer *et al.*, 1998; Howard e Mendenhall, 1975; Kraljic e Sharpatyi, 1974).

No presente estudo, realizou-se o método indireto, em que a geração de oxigênio singlete produzido pelos FS fenotiazínicos MB, TBO, NMBN, NMBN Zn e S137 foi observada pelo monitoramento espectrofotométrico da degradação (oxidação) do composto DPBF. A banda de absorção mais pronunciada do DPBF é na região próxima a 410 nm. O DPBF sofre uma reação específica com o oxigênio singlete, formando um endoperóxido, incolor, que se decompõe rapidamente em 1,2-dibenzoilbenzeno (incolor entre 350-450 nm) (**Figura 6**).

As soluções foram irradiadas em uma cubeta de quartzo (Hellma 110-QS) com 1 cm de caminho óptico, utilizando o arranjo de LED, em intervalos de 5 segundos, seguido de leitura no espectrofotômetro NanoPhotometer P-Class (IMPLEN GmbH, Munich, Alemanha). Controles onde o DPBF foi exposto apenas à luz na ausência dos FS, e controles onde o DPBF não foi exposto à luz, foram preparados em paralelo.

Para a quantificação de oxigênio singlete produzida pelos FS, foi traçado um gráfico do logaritmo neperiano da absorbância do DPBF ($\ln \text{Abs}_{\text{DPBF}}$) *versus* o tempo, obtendo-se a equação da reta, na qual o valor da taxa de degradação do FS (R) é representado pelo coeficiente angular da equação da reta. O rendimento quântico de oxigênio singlete (ϕ_{Δ}) foi calculado utilizando a seguinte equação (Gobo, et al., 2013):

$$\phi_{\Delta} = \frac{\phi_{\Delta}^{\text{std}} \times \mathbf{R} \times \mathbf{I}_{\text{abs}}^{\text{std}}}{\mathbf{R}^{\text{std}} \times \mathbf{I}_{\text{abs}}}$$

Onde, $\phi_{\Delta}^{\text{std}}$ é o rendimento quântico de oxigênio singlete para o fenotiazínico padrão. Foi utilizado como padrão o azul de metileno ($\phi_{\Delta}^{\text{std}} = 0,52$ em metanol). R e R^{std} é a taxa de fotodegradação do FS e do padrão, respectivamente. I_{abs} e $I_{\text{abs}}^{\text{std}}$ é a taxa de absorção de luz do

FS e do padrão, respectivamente. A I_{abs} é calculada pela fórmula $I_{\text{abs}} = 1 - 10^{-a}$, onde a é a média das absorbâncias mensuradas após o período de irradiação (entre 0 e 40 s).

3.6. Avaliação da atividade metabólica de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*

A atividade metabólica de microconídios pode ser avaliada através da conversão do fluorocromo FUN-1 (fluorescência verde) em estruturas cilíndricas intravacuolares (“Cylindrical intra-vacuolar structures” - CVIS, fluorescência vermelha) formadas durante os processos bioquímicos endógenos, tais como a produção de ATP. As células metabolicamente inativas emitem uma fluorescência verde. Para essa avaliação, 200 μL da suspensão de microconídios (4×10^6 microconídios mL^{-1}) de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* e 200 μL de meio de cultura RPMI 1640 ($2 \times$ concentrado) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA) foram colocados em microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram incubados durante 4 h a 28°C sob agitação de 150 rpm. Depois disso, os tubos foram centrifugados 3 vezes a $5000 \times g$ durante cinco minutos para remover o meio de cultura. Os microconídios 4 h-germinados foram resuspendidos em 400 μL de tampão HEPES 10 mM, pH 7,2 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA), suplementado com 2% de D(+)-Glucose (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA), e 10 μM FUN-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Os microtubos foram mantidos no escuro durante 30 min a 28°C , após esse período os microconídios foram analisados por citometria de fluxo (FACSCanto - Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, EUA). Dez mil eventos foram analisados pelo software FACSDiva (BD, San Jose, CA, EUA). Foram realizados três experimentos independentes. A conversão de FUN-1 para CVIS pela relação de fluorescência vermelha (585 ± 40 nm)/verde (530 ± 30 nm) também foi avaliada em microconídios não germinados e microconídios 4 h-germinados expostos a temperatura de 95°C (controle de morte). Dois experimentos independentes foram realizados.

3.7. Determinação dos parâmetros ótimos para a IFA dos microconídios não germinados das espécies de *Fusarium* com os fotossensibilizadores fenotiazínicos pela determinação da concentração inibitória mínima

A otimização das condições necessárias para a inativação fotodinâmica antimicrobiana (IFA) das diferentes espécies com os FS fenotiazínicos é um pré-requisito essencial. Os parâmetros mais apropriados para a IFA de cada espécie foram determinados por meio de experimentos iniciais, nos quais a eficácia de cada tratamento foi estimada por meio da concentração inibitória mínima (CIM). Em microplacas de 96 poços (TPP, Suíça), foram colocados 50 μL da suspensão de microconídios e 50 μL dos FS em diferentes concentrações. A concentração final dos microconídios foi de 4×10^5 células mL^{-1} . As concentrações finais dos FS diluídos em PBS, nas misturas foram 0; 1; 2,5; 5; 10; 12,5; 25; 50; 75; 100 e 200 μM para o MB, NMBN Zn e TBO e 0; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 12,5; 20; 25; 30; e 40 μM para o S137.

As microplacas foram mantidas no escuro por 30 min (período de pré-incubação) e, a seguir, foram expostas à luz com as fluências de 10, 15 e 20 J cm⁻² usando um arranjo de LED como fonte de luz. Microplacas-controle, protegidas da luz durante as exposições, foram preparadas em paralelo em todos os experimentos. Também foram preparados controles com os microconídios expostos à luz na ausência do FS. Após as exposições, 100 µL de meio de cultura RPMI 1640 (com o dobro da concentração original) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA) foram acrescentados aos poços. As microplacas foram incubadas no escuro, a 28°C, durante 4 dias. O crescimento foi avaliado visualmente e diariamente até o 4º dia, quando a CIM foi determinada. Foram realizados três experimentos independentes.

3.8. Determinação da fração de sobreviventes dos microconídios não germinados e 4 h-germinados das espécies de *Fusarium* na IFA com os fotossensibilizadores fenotiazínicos

A sobrevivência dos microconídios não germinados e germinados (4 h) de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* foi avaliada após a IFA com MB, TBO, NMBN, NMBN Zn e S137. A fim de obter os microconídios 4 h-germinados, 5 mL da suspensão de microconídios (4×10^6 microconídios mL⁻¹) e 5 mL do meio de cultura RPMI 1640 (2 vezes concentrada) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA) foram adicionados em um tubo cônico de 15 mL (Corning Incorporated, NY, EUA). Os tubos foram incubados durante 4 h a 28°C e agitação de 150 rpm. Depois da incubação, os tubos foram centrifugados a $5000 \times g$ durante cinco minutos para remover o meio de cultura RPMI 1640, e por fim foram resuspendidos em 5 mL de PBS, pH 7,4. Para avaliar a sobrevivência dos microconídios à IFA, 300 µL da solução de FS (MB, TBO, NMBN, NMBN Zn e S137) foram adicionados a 300 µL da suspensão dos microconídios não germinados e 4 h-germinados em microtubos de 1,5 mL (polipropileno; Axygen Scientific, CA, EUA). A concentração final de microconídios não germinados e 4 h-germinados nas misturas foi 2×10^6 microconídios mL⁻¹ e a concentração final de MB, TBO, NMBN, NMBN Zn e S137 foram 50, 75, 5, 5 e 10 µM, para *F. oxysporum*, respectivamente; 75, 75, 10, 10 e 10 µM para *F. moniliforme*, respectivamente, e 75, 75, 12,5, 12,5 e 10 µM para *F. solani*, respectivamente. Os microtubos foram mantidos no escuro durante 30 min a 28°C, e depois disso, os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram divididos em 8 grupos: (1) lavados antes da exposição à luz, para retirada do excesso de FS. Para isso, os microconídios foram centrifugados a $5000 \times g$ durante cinco min e resuspendidos em PBS, pH 7,4. Este procedimento foi repetido três vezes; (2) não lavados; (3) não lavados e 50 mM de manitol; (4) não lavados e 10 mM de azida de sódio; (5) não lavados e 10 mM de glutatona reduzida (GSH); (6) não lavados e cloreto de zinco nas seguintes condições: solução equimolar aos FS MB, TBO, NMBN e S137, para o cloreto de

zinco com concentração final de 50, 75, 5 e 10 μM , respectivamente para *F. oxysporum*; 75, 75, 10 e 10 μM para *F. moniliforme*; e 75, 75, 12,5, e 10 μM para *F. solani*; (7) não lavados e 10 mM de azida de sódio e cloreto de zinco nas mesmas concentrações descritas no item anterior; (8) não lavados e 10 mM de azida sódica adicionado de 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para o FS NMBN Zn.

Em seguida, 600 μL de suspensão de cada um dos 8 grupos foram colocados em placas de 24 poços (TPP, Suíça) e exposto as fluências de 0 (controle no escuro), 10 e 15 J cm^{-2} . Após as exposições, as suspensões foram agitadas e diluídas em PBS, pH 7,4 (10^{-1} a 10^{-3}), e 50 μL de cada diluição foram espalhados na superfície de 5 mL de PDA, suplementado com 1 g L^{-1} de ácido deoxicólico (sal sódico) (Fluka, Itália), em placas de Petri (60 $\times$ 15 mm). O ácido deoxicólico utilizado nessa concentração reduz o crescimento das colônias, tornando-as mais compactas, o que permite acompanhar o desenvolvimento dos fungos por um período maior de tempo. Foram preparadas três placas-réplica por tratamento. As placas foram incubadas a 28°C, no escuro, e a contagem das colônias foi iniciada após 24 h, com auxílio de estereomicroscópio (com ampliação de 8 $\times$), e estendidas por até 7 dias. Controles nos quais as células foram expostas apenas à luz, na ausência do FS, e controles nos quais as células foram tratadas com o FS, mas não foram expostas à luz, foram preparados em paralelo para todos os tratamentos. Os microconídios que não originaram colônias após 7 dias foram considerados mortos pelo tratamento. Foram realizados três experimentos independentes.

Os resultados da fração de sobreviventes serão expressos em "log de redução", um termo matemático utilizado para demonstrar o número relativo de células eliminadas de um determinado tratamento comparado com o controle não tratado. Por exemplo, 1-log de redução representa 10 vezes, 2-log de redução representa 100 vezes, 3-log de redução representa 1000 vezes, 4-log de redução representa 10000 vezes e 5-log de redução, significa uma redução de 100 mil vezes do inóculo inicial ou morte de 90,0%, 99,0%, 99,9%, 99,99% e 99,999%, respectivamente, de microconídios tratados.

3.9. Estudo microscópico da interação dos microconídios não germinados e 4 h-germinados com os fotossensibilizadores fenotiazínicos

O estudo microscópico dos microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* foi realizado para determinar a localização subcelular dos FS fenotiazínicos. Para produzir os microconídios 4 h-germinados, 8×10^6 microconídios mL^{-1} foram incubados em meio de cultura RPMI 1640 a 28°C durante 4 h. Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram então tratados com 100 μM de MB, TBO, NMBN Zn e S137, e lavados três vezes com PBS (5000 $\times$ g durante cinco minutos) antes de serem

observados no microscópio com aumento de $1000\times$ (Coleman N-120 microscópio, Coleman, Santo André, SP, Brasil). Na tentativa de identificar as estruturas celulares em que os FS se acumularam, os microconídios não germinados e os germinantes (4 h) também foram corados com os fluorocromos "4',6-diamidino-2phenylindole" (DAPI) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA) ($3\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) e FM4-64[®] (Invitrogen[™]) [$1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ em solução de 1% (vol/vol) dimetilsulfóxido (DMSO)], que possuem afinidade com material genético e membrana celular/lipídios, respectivamente. Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram tratados com cada um dos 2 corantes, e mantidos no escuro durante 1 h, lavados três vezes com PBS antes de serem observados com o auxílio de um Leica TCS SP8 microscópio confocal a laser (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) em ampliação de $630\times$ e zoom digital ($2\times$). As amostras foram iluminadas a 405 nm (DAPI) e 552 nm (FM4-64[®]) e os sinais foram capturados em dois canais, um para aquisição da fluorescência do DAPI (410-540 nm) e outro, para a fluorescência do FM4-64[®] (570-700 nm). Também foram obtidas imagens no campo claro para sobreposição de imagens.

3.10. Avaliação do efeito da IFA na permeabilidade da membrana celular de microconídios de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*

A permeabilidade da membrana celular após a IFA foi avaliada através da coloração de microconídios com iodeto de propídio (PI) e analisada por citometria de fluxo. O PI é internalizado apenas em células com danos graves na membrana. Para a análise, 300 μL da suspensão de microconídios e 300 μL da solução de cada FS (MB, TBO, NMBN Zn e S137) foram adicionados a placas de 24 poços de fundo plano (TPP, Suíça). A concentração final de microconídios foi 2×10^6 microconídios mL^{-1} e as concentrações finais de MB, TBO, NMBN Zn e S137 foram de 50, 75, 5 e 10 μM , respectivamente para *F. oxysporum*; 75, 75, 10 e 10 μM respectivamente para *F. moniliforme* e 75, 75, 12,5 e 10 μM respectivamente para *F. solani*. As placas foram mantidas no escuro durante 30 min a 28°C e expostos às fluências de 0, 10 e 15 J cm^{-2} . Microconídios não tratados com FS e nem exposto à luz foram utilizados como controle da viabilidade celular, e microconídios exposto a 95°C durante 1 h, foram usados como “controle de morte”. Após a IFA, os microconídios foram removidos dos poços para microtubos de 1,5 mL, e lavados uma vez com PBS (pH 7,4), e adicionado 1 μL de solução de PI (1 g L^{-1}) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA) imediatamente antes da aquisição do dado por citometria de fluxo (FACSCanto – Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). Dez mil eventos foram analisados pelo software FACSDiva (BD, San Jose, CA, EUA). Nós analisamos a porcentagem de células coradas com PI em cada condição da IFA. Foram realizados três experimentos independentes.

3.11. Avaliação do efeito da IFA na peroxidação de lipídios de microconídios de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*

Lipídios poliinsaturados são facilmente oxidados por espécies reativas de oxigênio resultando em uma série de reações, que tem o malondialdeído (MDA) como o principal produto. A peroxidação lipídica após a IFA foi avaliada com o Kit “Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit” (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA), seguindo as instruções do fabricante, com modificações. Após a IFA realizada como descrita acima, os microconídios foram recuperados a partir da microplaca de 96 poços para microtubos de 1,5 mL, e posteriormente centrifugado a $5000 \times g$ durante 5 min. Os microconídios foram resuspendidos em 300 μ L de tampão de lise de MDA, contendo 3 mL de BHT (# MAK085C Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA) (100 $\times$ concentrado), e homogeneizado em gelo. As amostras foram centrifugadas a $13000 \times g$ durante 10 min, para remover o material insolúvel. O sobrenadante de cada amostra foi colocado em um novo microtubo de 1,5 mL e foi adicionado 600 μ L de solução de ácido tiobarbitúrico [0,250 g de ácido tiobarbitúrico reconstituído em 7,5 mL de ácido acético glacial (JTBaker[®] Chemicals, Center Valley, USA), e o volume final foi ajustado a 25 mL com água] e incubado a 95°C durante 1 h. Imediatamente após, as amostras foram resfriadas em banho de gelo durante 10 min e em seguida 200 μ L de cada amostra foram adicionadas a uma microplaca de 96 poços de fundo plano para a análise. A leitura da absorbância foi feita em 532 nm, com o auxílio do equipamento Spectramax[®] Paradigm[®] Multi-Mode Detection Platform (Molecular Device LLC, Sunnyvale, CA, USA). A concentração de MDA foi calculada com base na curva padrão. Foram realizados três experimentos independentes.

3.12. Avaliação do efeito da IFA na carbonilação de proteínas de microconídios de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*

3.12.1. Inativação fotodinâmica antimicrobiana

Cinco mililitros da suspensão de microconídios (concentração final de 4×10^7 células mL⁻¹ em PBS, pH 7,4) e 5 mL da solução de FS (concentração final de 20 μ M para MB e TBO, e 2,5 μ M para NMBN Zn e S137) foram misturados em tubo cônico de 15 mL. Os tubos foram mantidos no escuro por 30 min. O conteúdo de cada tubo (10 mL) foi transferido para uma placa de Petri de 60 mm de diâmetro, que foi exposta à luz nas seguintes combinações: fluência de 10 J cm⁻² para 20 μ M de MB e TBO e fluência de 5 J cm⁻² para 2,5 μ M de NMBN e S137. Controles contendo a mesma concentração de FS e microconídios, porém não expostos à luz, foram preparados paralelamente a cada amostra irradiada. Cada experimento foi constituído de vinte exposições sucessivas a cada fluência e FS. Após a

irradiação, uma alíquota foi removida para ensaios de sobrevivência dos microconídios (**descrito no item 3.8.**). As células de cada tratamento foram imediatamente coletadas por centrifugação ($3000 \times g$, 5 min), lavadas 3 vezes com 5 mL de PBS e depois foram transferidas para microtubos de 2 mL, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -70°C até a extração de proteínas.

3.12.2. Extração e quantificação de proteínas

A cada microtubo de 2 mL, provenientes do **item anterior 3.12.1.**, foram adicionados 500 μL de tampão de extração [ureia 7 M, tiourea 2 M e CHAPS 4% (todos GE-Healthcare, Chalfont, UK)] e 500 μL de pérolas de vidro (425-600 μm , Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA). Foram adicionados ainda 5 μL de inibidor de protease (GE-Healthcare, Chalfont, UK). Os microconídios foram lisados por cinco ciclos de um minuto de agitação em “vortex” seguido de cinco minutos de incubação em gelo. Os tubos foram centrifugados a $10000 \times g$ por cinco minutos a 4°C e o sobrenadante resultante foi coletado. As proteínas contidas no sobrenadante foram purificadas pela adição de seis volumes de acetona (grau HPLC, Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA) e incubação “overnight” a -20°C . Após remoção da acetona por centrifugação ($10000 \times g$ por cinco minutos a 4°C), o precipitado proteico foi ressuspensionado no mesmo tampão de extração e quantificado usando-se o 2-D Quant Kit (GE-Healthcare, Chalfont, UK).

3.12.3. Análise de carbonilação de proteínas

A carbonilação de proteínas após a IFA foi avaliada com o Kit “Protein Carbonyl Assay Kit” (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA), utilizando as instruções do fabricante, com modificações. Inicialmente foram adicionados 10 μL de streptozocina a 10% (m/v) em 100 μL de cada amostra contendo 0,5 mg de proteína, e incubadas durante 15 min, à temperatura ambiente. Posteriormente foram centrifugadas a $13000 \times g$ por 5 min e o sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, no qual foram adicionados 100 μL de solução de 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA), em seguida foram agitadas em “vortex” e incubadas por 30 min, à temperatura ambiente. Após esse período foram adicionados 30 μL de solução de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA). As amostras foram agitadas mecanicamente em “vortex” e incubadas no gelo por 15 min e centrifugadas a $13000 \times g$ durante 2 min, para a remoção do sobrenadante. Quinhentos microlitros de acetona gelada foram adicionados a cada pellet e colocadas em banho ultrassônico durante 2 min, seguido de incubação “overnight” a -20°C . Após remoção da acetona por centrifugação ($13000 \times g$ por cinco minutos a 4°C), o precipitado foi ressuspensionado em 200 μL solução de 6 M de guanidina (Sigma-Aldrich, Inc.,

MO, EUA). Cento e oitenta microlitros de cada amostra foram adicionadas a uma microplaca de 96 poços de fundo plano para a análise. A leitura da absorbância foi feita em 375 nm, com o auxílio do equipamento Spectramax® Paradigm® Multi-Mode Detection Platform (Molecular Device LLC, Sunnyvale, CA, USA). Os 20 µL restantes foram utilizados para realizar nova quantificação de proteína. A concentração de proteína carbonilada foi calculada conforme as instruções do fabricante. Foram realizados dois experimentos independentes.

3.13. Efeito da IFA na fragmentação do núcleo de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*

A fragmentação do núcleo após a IFA foi avaliada através da utilização de uma solução hipotônica fluorescente (HFS – “Hypotonic fluorescent solution”), descrito por Nicoletti e colaboradores, 1991 e Riccardi & Nicoletti 2006. Espécies reativas de oxigênio podem facilmente causar danos no DNA da célula levando a fragmentação do DNA, e consequentemente, a perda do DNA nuclear. O uso de um fluorocromo, como o PI, que é capaz de se ligar e marcar o DNA torna possível a avaliação da fragmentação do DNA por citometria de fluxo, diferenciando células com núcleo normal (DNA não fragmentado) de células com núcleo fragmentado (DNA fragmentado). Para a análise, 300 µL da suspensão de microconídios e 300 µL da solução de FS (MB, TBO, NMBN Zn e S137) foram adicionados a placas de 24 poços de fundo plano (TPP, Suíça). A concentração final de microconídios não germinados e 4 h-germinados foi 2×10^6 microconídios mL⁻¹ e a concentração final de MB, TBO, NMBN Zn e S137 foram de 50, 75, 5 e 10 µM, respectivamente para *F. oxysporum*; 75, 75, 10 e 10 µM respectivamente para *F. moniliforme* e 75, 75, 12,5 e 10 µM respectivamente para *F. solani*. As placas foram mantidas no escuro durante 30 min a 28°C e expostas as fluências de 0, 10 e 15 J cm⁻². Após a realização da IFA, os microconídios não germinado e 4 h-germinados foram recuperados a partir dos poços, para tubos cônicos de 15 mL, e posteriormente centrifugado a $5000 \times g$ durante 5 min. Os microconídios foram resuspendidos em 500 µL de PBS (pH, 7,4) e os microconídios foram fixados com 4,5 mL de álcool 70% (v/v) gelado e mantido em banho de gelo durante 30 min. Após este período os microconídios foram lavados 3 vezes com PBS (pH, 7,4), centrifugado a $5000 \times g$ durante 5 min. Posteriormente foram adicionados 400 µL de HFS (1% (m/v) de citrato de sódio, 1% (v/v) de triton X-100 e 50 µg mL⁻¹ de iodeto de propídio). Os tubos foram incubados por 30 min no escuro a 4°C. Após esse período, os microconídios foram analisados por citometria de fluxo (FACSCanto - Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, EUA). Cinco mil eventos foram analisados pelo software FACSDiva (BD, San Jose, CA, EUA). Foram realizados três experimentos independentes. Microconídios não tratados com FS e nem exposto à luz foram utilizados

como controle sem dano no DNA, e microconídios expostos a 100 μM de 2-[2-(3-Chlorophenyl)hydrazinylydene]propanedinitrile (CCCP) durante 2 h, foram usados como controle de dano ao DNA.

3.14. Avaliação da virulência das espécies de *Fusarium* utilizando o modelo invertebrado *Galleria mellonella*

No presente trabalho o perfil de virulência das linhagens *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* foi avaliado utilizando larvas de *G. mellonella*, seguindo o protocolo sugerido por Renwick (2006). As larvas foram mantidas em recipiente de vidro (30 cm de altura por 20 cm de largura) a 28°C no escuro. Para a alimentação das larvas foi preparada ração composta por cera de abelha, leite em pó, extrato de levedura, fubá, mel de abelha e soja triturada. As larvas foram mantidas com acesso a ração até alcançarem o sexto instar de desenvolvimento, cujo peso varia entre 200 e 250 mg. Após o completo desenvolvimento (sexto instar), as larvas foram privadas da alimentação e separadas em grupos de 10 unidades em placas de Petri de vidro (90 $\times$ 15 mm) para cada teste proposto.

Para a avaliação da virulência foram preparadas suspensões de microconídios não germinados das linhagens *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*, nas concentrações de 2×10^8 , 2×10^7 , 2×10^6 , 2×10^5 e 2×10^4 microconídios mL^{-1} . A infecção artificial em larvas de *G. mellonella* foi feita utilizando uma microseringa de Hamilton modelo 7000.5KH de 10 μL . Para cada avaliação, as larvas foram inoculadas com 5 μL da suspensão de microconídios, no centro da ventosa da última pró-pata direita. Foram feitos controles onde as larvas foram inoculadas com 5 μL de PBS, pH 7,4, e controles nos quais não foram feitas inoculações nas larvas. Entre as infecções foram realizadas rigorosas baterias de lavagem com hipoclorito de sódio, etanol 70% e água autoclavada. Após a infecção artificial, as larvas foram incubadas a 28°C, privadas de alimentação e iluminação direta. Foram feitas avaliações da sobrevivência das larvas a cada 12 h e também foram retiradas a pré-pupa com o objetivo de retardar a metamorfose. Foram realizados três experimentos independentes.

3.15. Efeito da IFA com os fotossensibilizadores fenotiazínicos na sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com microconídios de *F. moniliforme*

Após avaliar o perfil de virulência das espécies de *Fusarium* em larvas de *G. mellonella*, foi avaliado o efeito da IFA em lavas de *G. mellonella* infectadas com microconídios de *F. moniliforme*. A concentração de microconídios foi de 2×10^6 microconídios mL^{-1} , e a concentração de FS foi 750, 750, 100 e 100 μM , respectivamente para MB, TBO, NMBN Zn e S137. A infecção artificial em larvas de *G. mellonella* com microconídios, foi feita como descrita no item anterior. Após a infecção artificial das larvas

foram feitas novas inoculações com 10 μ M de cada FS. As larvas foram mantidas no escuro durante 30 min a 28°C, e depois disso, exposta as fluências de 0 (controle no escuro) e 15 J cm^{-2} . Foram feitos controles onde as larvas foram inoculadas com 5 μ L de PBS, pH 7,4, controles no qual, as larvas foram apenas expostas à luz, controles onde as larvas foram inoculadas apenas os FS e não expostos à luz, controles onde as larvas foram inoculadas FS e expostas à luz e controles nos quais não foram feitas inoculações nas larvas e não expostas à luz. Após a IFA, as larvas foram incubadas a 28°C, privadas de alimentação e iluminação direta. Foram feitas avaliações da sobrevivência das larvas a cada 12 h e também foram retiradas a pré-pupa com o objetivo de retardar a metamorfose.

3.16. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey para comparar os efeitos dos diferentes tratamentos (exceto teste utilizando *G. mellonella*). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Para o teste de virulência e a IFA em larvas de *G. mellonella*, os dados foram submetidos ao método estatístico Log-rank (Matel-Cox), para avaliar a significância entre as curvas de sobrevivência. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. A análise estatística foi feita utilizando o software Graph pad Prism (v 5.0: Graph pad Software, La Jolla, CA, EUA).

4. Resultados

4.1. Determinação da absortividade molar dos fotossensibilizadores fenotiazínicos e irradiância espectral efetiva do LED

Os fotossensibilizadores (FS) interagem com energia luminosa, gerando espécies eletronicamente excitadas com características físico-químicas diferentes das encontradas em seu estado fundamental. Algumas características fotofísicas dos FS demonstram a sua eficiência na IFA e entre elas o valor de absortividade molar (ϵ) é a mais importante. Valores altos de ϵ facilitam os processos radiativos e não radiativos que iniciam o processo de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a IFA. Os estudos fotofísicos foram feitos a partir das soluções dos FS feitas em metanol, na concentração de 10 μM . Os valores da ϵ de cada FS são mostrados na **Tabela 1**. Os FS com maior valor de ϵ foram o MB, com $6,9 \times 10^5 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$, e o NMBN Zn, com $6,2 \times 10^5 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$. Após a determinação da ϵ de cada FS, também é importante avaliar se a fonte de irradiação utilizada é adequada para a excitação dos FS. Nós utilizamos um arranjo de LED com espectro de emissão entre 600 e 650 nm (pico em 635 nm). A partir do valor da ϵ foi calculada a irradiância efetiva (I_{ef}). Os FS que possuem os maiores valores de I_{ef} são o NMBN Zn com $1,080 \text{ W } \mu\text{mol}^{-1}$, o MB com $0,930 \text{ W } \mu\text{mol}^{-1}$ e o TBO com $0,885 \text{ W } \mu\text{mol}^{-1}$ (**Tabela 1**). Este valor representa a quantidade de energia que cada FS é capaz de absorver da fonte de luz utilizada (LED). Os espectros da absortividade molar e da irradiância espectral efetiva para cada FS são mostrados na **Figura 7**.

Tabela 1 – Propriedades fotofísicas dos fotossensibilizadores fenotiazínicos. As propriedades fotofísicas foram determinadas em metanol.

Fotossensibilizador	λ_{max} (nm)	ϵ ($\text{m}^2 \text{ mol}^{-1}$)	I_{ef} ($\text{W } \mu\text{mol}^{-1}$)
MB	655	$6,9 \times 10^5$	0,930
TBO	626	$5,4 \times 10^5$	0,885
NMBN	624	$4,1 \times 10^5$	0,685
NMBN-Zn	627	$6,2 \times 10^5$	1,080
S137	672	$5,7 \times 10^5$	0,452

Figura 7 – Espectro da absorptividade molar dos fotossensibilizadores fenotiazínicos, MB (A), TBO (B), NMBN (C), NMBN Zn (D) e S137 (E); e a Irradiância espectral efetiva do LED. Para o cálculo da absorptividade molar foi utilizado a formula $A = \varepsilon \times c \times l$. Os FS foram preparados em metanol na concentração de 10 μM , a absorbância foi feita em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico. A irradiância espectral efetiva foi calculada multiplicando a absorptividade molar pelo espectro de emissão do LED ($I_{ef} = Abs_m \times Em_{LED}$).

4.2. O rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_{Δ}) dos fotossensibilizadores fenotiazínicos

A sonda química DPBF foi utilizada para o monitoramento espectrofotométrico das reações de produção de oxigênio singleto, pelos FS fenotiazínicos foto-excitado. A banda de absorção mais pronunciada de DPBF é a região próxima a 410 nm (**Figura 8**). O DPBF sofre uma reação específica com o oxigênio singleto, formando um endoperóxido incolor, que se decompõe rapidamente em 1,2-dibenzoilbenzeno. Os estudos comparativos foram conduzidos por excitação (utilizando o arranjo de LED) dos FS nas mesmas condições experimentais, comparando a degradação do DPBF de cada FS com a degradação do DPBF do MB, um FS padrão de ϕ_{Δ} conhecido. A oxidação do DPBF mediada pelo oxigênio singleto produzido por cada FS é mostrada na **Figura 8**. Os resultados mostraram que os FS NMBN Zn e NMBN foram os mais eficientes na produção de oxigênio singleto. Os valores de ϕ_{Δ} para o NMBN Zn foi 0,71 e 0,64 para o NMBN. Os valores de ϕ_{Δ} para todos os FS estão na **Tabela 2**. O solvente utilizado para realizar os experimentos foi o metanol.

Tabela 2 – Rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_{Δ}) dos fotossensibilizadores fenotiazínicos. As soluções dos FS foram preparadas em metanol e o MB foi utilizado como padrão para o cálculo do ϕ_{Δ} .

Fotossensibilizador	ϕ_{Δ}
MB	0,52
TBO	$0,45 \pm 0,009$
NMBN	$0,64 \pm 0,015$
NMBN-Zn	$0,71 \pm 0,023$
S137	$0,55 \pm 0,024$

Figura 8 – Oxidação de DPBF mediada pelo oxigênio singleto produzido durante a fotoexcitação dos fotossensibilizadores MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C), NMBN (D) e S137 (E). Solução de DPBF sem a presença de FS (F) irradiada em intervalos de 5 s foi utilizado como controle.

Também foram feitos experimentos para avaliar o efeito do cloreto de zinco na oxidação de DPBF e para isso foi adicionada uma solução de cloreto de zinco (10 μM) nos FS MB, TBO, NMBN e S137. FS que possuem íons metálicos, como Zn^{2+} , Al^{3+} e Ga^{3+} , em suas formulações são capazes de ficarem no estado excitado tripleto por longos períodos, aumentando a produção de oxigênio singleto (Oliveira, *et al.*, 2009). A oxidação do DPBF mediada pelo oxigênio singleto produzido por cada FS adicionado de cloreto de zinco é mostrada na **Figura 9**. Os resultados mostraram que o cloreto de zinco aumentou a oxidação de DPBF, e consequentemente o ϕ_{Δ} para os FS MB, TBO NMBN (**Tabela 3**). O cloreto de zinco não apresentou nenhum efeito para o FS S137.

Tabela 3 – Rendimento quântico de oxigênio singlete (ϕ_{Δ}) dos fotossensibilizadores fenotiazínicos na presença de cloreto de zinco. As soluções dos FS e cloreto de zinco foram preparados em metanol e o MB foi utilizado como padrão para o cálculo do ϕ_{Δ} .

Fotossensibilizador	ϕ_{Δ}
MB	0,52
MB ZnCl ₂	0,57 ± 0,013
TBO ZnCl ₂	0,56 ± 0,014
NMBN ZnCl ₂	0,68 ± 0,017
S137 ZnCl ₂	0,54 ± 0,026

Figura 9 – Oxidação de DPBF mediada pelo oxigênio singlete produzido durante a foto-excitação dos fotossensibilizadores adicionando cloreto de zinco, MB ZnCl₂ (A), TBO ZnCl₂ (B), NMBN ZnCl₂ (C), e S137 ZnCl₂ (D). Solução de DPBF sem a presença de FS (E) irradiada em intervalos de 5 s foi utilizado como controle.

4.3. Avaliação da atividade metabólica de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*

A atividade metabólica foi avaliada por intermédio da conversão do corante fluoróforo FUN-1 de fluorescência verde para a fluorescência vermelha (CIVS), que ocorre por meio de processos bioquímicos endógenos para a produção de ATP. Assim, a conversão de FUN-1 a CIVS foi avaliada em microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*. Microconídios mortos pela exposição à temperatura de 95°C foram utilizados como controle de morte (ausência de atividade metabólica). A relação da fluorescência vermelha/verde no controle de morte foi menor que a relação encontrada nos microconídios não germinado e 4 h-germinado. A relação da fluorescência vermelha/verde em microconídios 4 h-germinados de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* foram aproximadamente 2 vezes maior que a relação da fluorescência vermelha/verde em microconídios não germinados ($P < 0,05$ para todas as comparações) (**Figura 10**). Assim, os microconídios germinados por 4 horas possuem um metabolismo mais ativos que os não germinados.

Figura 10 – Atividade metabólica de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*. A atividade metabólica dos microconídios foi avaliada pela conversão do fluoróforo FUN-1 (fluorescência verde) em estruturas cilíndricas intravacuolares (Cylindrical intra-vacuolar structures – CIVS, fluorescência vermelha). Cada valor é a média de 2 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

4.4. Determinação dos parâmetros ótimos para a inativação fotodinâmica antimicrobiana dos microconídios não germinados das espécies de *Fusarium* com os fotossensibilizadores fenotiazínicos pela determinação da concentração inibitória mínima

A eficácia da IFA com cada FS (MB, TBO, NMBN Zn e S137) combinada com diferentes fluências de luz vermelha (0, 10, 15 e 20 J cm⁻²) foi inicialmente avaliadas para determinar os valores de concentração inibitória mínima (CIM). O tratamento com os FS MB, TBO e NMBN Zn (1 - 200 µM) na ausência de luz não inibiu o crescimento dos microconídios de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* (**Tabela 4**). Apenas o FS S137 apresentou toxicidade no escuro, no qual os intervalos de CIM foram de 25-30 µM para *F. oxysporum* e *F. moniliforme* e 12,5-25 µM para *F. solani* (**Tabela 4**). A exposição dos microconídios a luz vermelha (fluências de 0, 10, 15 e 20 J cm⁻²) na ausência dos FS não inibiu o desenvolvimento dos microconídios de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* (dados não mostrados). A IFA com todos os FS e fluências de luz inibiu o desenvolvimento de todas as espécies. A CIM para todos os FS e fluências são mostradas na **Tabela 4**. Embora os valores de CIM tenham variado entre os FS e as espécies avaliadas, de maneira geral os valores de CIM diminuíram com o aumento da fluência de luz. Os FS mais eficazes foram o NMBN Zn e S137, para todas as fluências de luz e espécies avaliadas. A IFA com NMBN Zn (15 J cm⁻²) inibiu o crescimento de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* nas concentrações 5, 10 e 12,5 µM. A IFA com S137 (15 J cm⁻²) inibiu o crescimento de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* na concentração de 10 µM.

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima (μM) da IFA com os fotossensibilizadores fenotiazínicos MB, TBO, NMBN e S137 em *F.oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*. Os resultados da CIM são expressos como intervalos observados em três experimentos independentes.

	FS/Fluência	0 J cm ⁻²	10 J cm ⁻²	15 J cm ⁻²	20 J cm ⁻²
<i>F. oxysporum</i>	MB	>200 μM	50-75 μM	50 μM	12.5-25 μM
	TBO	>200 μM	75 μM	75 μM	25-50 μM
	NMBN Zn	>200 μM	5-12.5 μM	5-10 μM	2.5 μM
	S137	25-30 μM	12.5 μM	10 μM	5 μM
<i>F. moniliforme</i>	MB	>200 μM	75-150 μM	75-100 μM	25 μM
	TBO	>200 μM	75-100 μM	75 μM	10-12.5 μM
	NMBN Zn	>200 μM	5-10 μM	10 μM	10 μM
	S137	25-30 μM	10 μM	10 μM	5 μM
<i>F. solani</i>	MB	>200 μM	75-100 μM	75 μM	25-75 μM
	TBO	>200 μM	75 μM	75 μM	12.5-25 μM
	NMBN Zn	>200 μM	5-25 μM	5-12.5 μM	2.5-5 μM
	S137	12.5-25 μM	5-10 μM	5-10 μM	5 μM

4.5. Avaliação da eficácia da inativação fotodinâmica antimicrobiana nos microconídios não germinados e 4 h-germinados das espécies de *Fusarium* com os fotossensibilizadores fenotiazínicos pela determinação da fração de sobreviventes

A fração de sobreviventes na IFA de microconídios de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* foi avaliada quanto ao estado metabólico do microconídio (quiescente e 4 h-germinado) além do efeito da retirada do excesso de cada FS antes da IFA. Ainda, foi avaliada a adição de antioxidantes, como manitol, azida de sódio e GSH, com o intuito de avaliar o efeito das EROs produzidas durante a IFA, provenientes das reações do tipo I e Tipo II. Também foi avaliado o efeito da adição de cloreto de zinco aos FS fenotiazínicos na morte dos microconídios das espécies de *Fusarium*.

Experimentos controles foram realizados onde exposições apenas à luz vermelha (efeito da luz) e o tratamento somente com os FS MB, TBO, NMBN, NMBN Zn e S137 sem exposição à luz vermelha (toxicidade no escuro) não matou microconídios de nenhuma das três espécies avaliadas ($P > 0,05$ para todas as espécies). Adicionalmente, o tratamento com MB, TBO, NMBN, NMBN Zn e S137, adicionando manitol, azida de sódio, GSH, cloreto de

zinco e EDTA, na ausência de luz, também não matou microconídios não germinados e 4 h-germinados de nenhuma das três espécies avaliadas ($P > 0,05$ para todas as espécies) (Figuras suplementares 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9).

4.5.1. Determinação da fração de sobreviventes de microconídios não germinados e 4 h-germinados das espécies de *Fusarium*, tratados com os fotossensibilizadores fenotiazínicos, lavados ou não, antes da inativação fotodinâmica antimicrobiana

A avaliação da IFA nos microconídios não germinados e 4 h-germinado das espécies de *Fusarium*, foi dividido em dois grupos onde o grupo 1 representa a lavagem dos microconídios para a remoção do excesso dos FS e o grupo 2 representa o tratamento com os FS fenotiazínicos sem a lavagem. A morte dos microconídios não germinados e 4 h-germinados causado pela IFA, para os grupos 1 e 2 foi observado para todos os FS e todas as fluências ($P < 0,05$).

O efeito da IFA sem a remoção do excesso do FS em microconídios não germinados com o MB e fluências de 10 e 15 J cm⁻² resultou em aproximadamente 4 e 5-log de redução da sobrevivência de microconídios de *F. oxysporum* (MB 50 µM); 1 e 3-log de redução para *F. moniliforme* (MB 75 µM) e 3,5 e 5-log de redução para *F. solani* (MB 75 µM) (Figuras 11A, 12A e 13A). A IFA com TBO, sem a remoção do excesso do FS, e fluências de 10 e 15 J cm⁻² resultou em aproximadamente 4 e 5-log de redução da sobrevivência de microconídios de *F. oxysporum* (TBO 75 µM); 1 e 2-log de redução para *F. moniliforme* (TBO 75 µM) e 1,5 e 3-log de redução para *F. solani* (TBO 75 µM) (Figuras 11B, 12B e 13B). A IFA com NMBN Zn (5, 10 e 12,5 µM), sem a remoção do excesso do FS, e fluências de 10 e 15 J cm⁻² resultou em aproximadamente 5-log de redução da sobrevivência de todas as espécies (Figuras 11C, 12C e 13C). A IFA com S137 (10 µM), sem a remoção do excesso do FS, e fluências de 10 e 15 J cm⁻² resultou em aproximadamente 3 e 5-log de redução da sobrevivência para *F. oxysporum*, 1 e 3-log de redução para *F. moniliforme* e 5-log redução para *F. solani* (Figuras 11D, 12D e 13D). A lavagem dos microconídios não germinados para a remoção do excesso de FS antes da exposição à luz reduziu o efeito da IFA na fluência de 10 J cm⁻² para o MB (*F. oxysporum* e *F. solani*) e o NMBN Zn (*F. oxysporum* e *F. moniliforme*). Com o aumento da fluência para 15 J cm⁻² a lavagem reduziu o efeito da IFA apenas para o MB (*F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*) (Figuras 11, 12 e 13).

O efeito da IFA sem a remoção do excesso do FS em microconídios 4 h-germinados com o MB e fluências de 10 e 15 J cm⁻² resultou em aproximadamente 5-log de redução da sobrevivência dos germinantes para *F. oxysporum* (MB 50 µM); 3 e 4-log de redução para *F. moniliforme* (MB 75 µM) e 4 e 5-log de redução para *F. solani* (Figuras 11A, 12A e 13A). A

IFA com TBO (75 μM), sem a remoção do excesso do FS, e fluências 10 e 15 J cm^{-2} resultou em aproximadamente 5-log de redução para *F. oxysporum* e *F. moniliforme*; e 3-log de redução para *F. solani* (**Figuras 11B, 12B e 13B**). A IFA com NMBN Zn, sem a remoção do excesso do FS, e fluências de 10 e 15 J cm^{-2} resultou em aproximadamente 5-log de redução da sobrevivência de *F. oxysporum* (NMBN Zn 5 μM) e *F. moniliforme* (NMBN Zn 10 μM); e 4,5-log de redução para o *F. solani* (NMBN Zn 12,5 μM) (**Figuras 11C, 12C e 13C**). A IFA com S137 (10 μM), sem a remoção do excesso do FS, e fluências de 10 e 15 J cm^{-2} resultou em aproximadamente 5-log de redução para *F. oxysporum* e *F. solani*; e 4,5 e 5-log de redução para *F. moniliforme* (**Figuras 11D, 12D e 13D**). A lavagem para a remoção do excesso de FS antes da exposição à luz reduziu a eficiência da IFA apenas para o FS MB na fluência de 10 J cm^{-2} para *F. oxysporum* ($P < 0,05$). Para os outros tratamentos, a redução causada pela lavagem dos germinantes não foi significativa ($P > 0,05$) (**Figuras 11, 12 e 13**).

Figura 11 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. oxysporum* com MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e lavados ou não lavados antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

Figura 12 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. moniliforme* com MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e lavados ou não lavados antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

Figura 13 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. solani* com MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e lavados ou não lavados antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

4.5.2 Estudo microscópico da interação dos microconídios não germinados e 4 h-germinados com os fotossensibilizadores fenotiazínicos

Foram feitos estudos microscópicos na tentativa de determinar a localização subcelular de cada FS em microconídios não germinados e 4 h-germinados das espécies de *Fusarium*. Pela microscopia de campo claro foi observada a internalização do TBO e NMBN nos microconídios não germinados de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*, enquanto que nos microconídios 4 h-germinados foi observada a internalização do MB, TBO e NMBN (**Figuras 14, 15 e 16**). Não foi observada a internalização do S137 nos microconídios não germinados e 4 h-germinados das espécies de *Fusarium* estudadas neste trabalho. Em microscopia de fluorescência foi observada a marcação das vesículas lipídicas pelo corante fluoróforo FM4-64[®]. Em comparação com a localização dos FS TBO e NMBN no microconídio não germinado e com MB, TBO e NMBN no microconídio 4 h-germinado é possível indicar o provável acúmulo dos FS nas estruturas membranosas como os pequenos vacúolos presentes no citoplasma dos microconídios (**Figuras 14, 15 e 16**). Além disso, foi observado que a incubação do S137 na concentração de 100 µM causou a formação de grandes vesículas no citoplasma dos microconídios 4 h-germinados (**Figuras 14 e 16**). Os FS fenotiazínicos são corantes capazes de absorver a fluorescência na região do vermelho o que inviabilizou a coloração simultânea dos FS com o fluoróforo FM4-64[®].

Figura 14 – Microscopia óptica e de fluorescência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. oxysporum*. **A** e **I**- campo claro; **B** e **J**- DAPI; **C** e **K**- FM4-64; **D** e **J**- imagem sobreposta com DAPI, FM4-64 e campo claro (software Leica Application Suite X); **E** e **M**- MB 100 μ M; **F** e **N**- NMBN Zn 100 μ M; **G** e **O**- TBO 100 μ M; **H** e **P**- S137 100 μ M. Antes da microscopia, o excesso de FS foi removido por lavagens. As setas indicam (**P**), vesículas formadas no interior do citoplasma de microconídios 4 h-germinados após o tratamento com S137. Barra de escalas, de 10 μ m. A microscopia de fluorescência foi feita no aumento de 630 $\times$ e ampliação digital de 2 $\times$ em microscópio confocal Leica TCS SP8 e campo claro no aumento de 1000 $\times$ em microscópio Coleman N-120.

Figura 15 – Microscopia óptica e de fluorescência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. moniliforme*. **A** e **I**- campo claro; **B** e **J**- DAPI; **C** e **K**- FM4-64; **D** e **J**- imagem sobreposta com DAPI, FM4-64 e campo claro (software Leica Application Suite X); **E** e **M**- MB 100 μM; **F** e **N**- NMBN Zn 100 μM; **G** e **O**- TBO 100 μM; **H** e **P**- S137 100 μM. Antes da microscopia, o excesso de FS foi removido por lavagens. Barra de escalas, de 10 μm. A microscopia de fluorescência foi feita no aumento de 630 × e ampliação digital de 2 × em microscópio confocal Leica TCS SP8 e campo claro no aumento de 1000 × em microscópio Coleman N-120.

Figura 16 – Microscopia óptica e de fluorescência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. solani*. **A** e **I**- campo claro; **B** e **J**- DAPI; **C** e **K**- FM4-64; **D** e **J**- imagem sobreposta com DAPI, FM4-64 e campo claro (software Leica Application Suite X); **E** e **M**- MB 100 μM; **F** e **N**- NMBN Zn 100 μM; **G** e **O**- TBO 100 μM; **H** e **P**- S137 100 μM. Antes da microscopia, o excesso de FS foi removido por lavagens. As setas indicam (**P**), vesículas formadas no interior do citoplasma de microconídios 4 h-germinados após o tratamento com S137. Barra de escalas, de 10 μm. A microscopia de fluorescência foi feita no aumento de 630 × e ampliação digital de 2 × em microscópio confocal Leica TCS SP8 e campo claro no aumento de 1000 × em microscópio Coleman N-120.

4.5.3. Avaliação do efeito da adição dos antioxidantes, manitol, azida de sódio e glutathiona reduzida, na inativação fotodinâmica antimicrobiana com os fotossensibilizadores fenotiazínicos

Com o objetivo de avaliar o efeito da supressão das EROs hidroxila radicalar ($\cdot\text{OH}$) e do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) gerados na IFA com os FS fenotiazínicos na sobrevivência dos microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*, foram feitos três grupos de tratamentos, onde foram adicionados antes da exposição à luz, sem a remoção do excesso do FS, o manitol, a azida sódica e a GSH, respectivamente, nos grupos 3, 4 e 5. O manitol tem por objetivo avaliar o efeito da $\cdot\text{OH}$, pois possui grande afinidade por esse radical; com a azida de sódio é possível avaliar o efeito do $^1\text{O}_2$ no microconídio, uma vez que é um sal que possui grande afinidade pelo $^1\text{O}_2$ (Baltazar *et al.*, 2015); e a glutathiona reduzida (GSH), antioxidante de ocorrência natural em células que possui afinidade com todos os tipos de EROs (Monea *et al.*, 2014), com o intuito de avaliar o efeito das EROs produzidas durante a IFA, provenientes das reações do tipo I e Tipo II.

Neste experimento foi adicionado o FS NMBN sem a molécula de zinco em sua formulação. O intuito de utilizar esta formulação do NMBN foi de avaliar a influência da molécula de zinco na produção das EROs, principalmente o oxigênio singleto. Assim, a IFA com NMBN e fluências de 10 e 15 J cm⁻² resultou em aproximadamente 1,5 e 3-log de redução da sobrevivência de microconídios de *F. oxysporum* (NMBN 5 µM); 3,5-log de redução nas fluências de 10 e 15 J cm⁻² para *F. moniliforme* (NMBN 10 µM) e 1,5 e 3,5-log de redução para *F. solani* (NMBN 12,5 µM) (**Figuras 17, 18 e 19**). Em comparação com a IFA com NMBN Zn observamos que a IFA com NMBN foi menos efetiva na redução da sobrevivência dos microconídios não germinado e 4 h-germinado, isso demonstra que a molécula de zinco tem uma importante participação na produção das EROs durante a IFA.

A adição de manitol não inibiu o efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados, para os FS testados (MB, TBO, NMBN, NMBN Zn, e S137) e em todas as espécies de *Fusarium* ($P > 0,05$). Entretanto, a adição de azida de sódio na solução dos FS MB, TBO, NMBN e S137 apresentou uma diminuição significativa no efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados em todas as espécies de *Fusarium* ($P < 0,05$). Somente para o FS NMBN Zn (fluência de 15 J cm⁻²), a adição de azida de sódio, não apresentou uma redução significativa na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados em todas as espécies de *Fusarium* ($P > 0,05$). A adição de GSH inibiu completamente o efeito da IFA para todos os FS avaliados

(MB, TBO, NMBN, NMBN Zn, e S137), para todas as espécies de *Fusarium* ($P < 0,05$) (**Figuras 17, 18 e 19**).

Figura 17 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. oxysporum* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 4 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de manitol; (3) Adição de azida de sódio e (4) Adição de glutathiona reduzida (glutathiona), antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

Figura 18 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. moniliforme* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 4 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de manitol; (3) Adição de azida de sódio e (4) Adição de glutathiona reduzida (glutathiona), antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

4.5.4. Avaliação do efeito da adição de cloreto de zinco aos fotossensibilizadores fenotiazínicos na inativação fotodinâmica antimicrobiana

Na tentativa de elucidar o motivo da diferença encontrada entre a sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados ao tratamento do FS NMBN Zn com azida de sódio em relação aos outros FS (MB, TBO, NMBN e S137) que não possuem zinco associado a sua estrutura, foram feitos mais três grupos de tratamentos: Grupo (6) onde foi adicionada antes da exposição à luz, solução de cloreto de zinco equimolar aos FS; Grupo (7) no qual foi adicionado ao tratamento antes da exposição à luz, uma solução de cloreto de zinco nas mesmas condições descritas no grupo 6 e azida de sódio (10 mM); e Grupo (8) em que foi adicionado EDTA ao tratamento antes da exposição à luz apenas para o FS NMBN Zn para a retirada do zinco presente na formulação do FS e também foi adicionado azida de sódio.

A adição de cloreto de zinco aos FS (MB, TBO, NMBN e S137) aumentou o número de microconídios não germinados mortos apenas para o FS NMBN, em todas as espécies de *Fusarium*. Para o tratamento utilizando os microconídios 4 h-germinados este aumento também foi observado apenas para o FS NMBN, porém apenas para a espécie *F. oxysporum* ($P < 0,05$) (**Figuras 20G, 20H, 21G e 22G**). Para os demais tratamentos (MB, TBO e S137), não houve diferença no número de microconídios não germinados e 4 h-germinados mortos, quando comparado com o experimento não lavado ($P > 0,05$). A adição de solução de cloreto de zinco e azida de sódio aos FS (MB, TBO, NMBN) ocasionou um aumento no número de microconídios não germinados e 4 h-germinados mortos, quando comparado com o experimento em que foi adicionado apenas azida de sódio para todas as espécies de *Fusarium* (**Figuras 20, 21 e 22**). Este efeito não foi observado para o FS S137. A adição de EDTA ao FS NMBN Zn diminuiu o número de microconídios não germinados mortos, para as espécies *F. oxysporum* e *F. moniliforme*. A adição de EDTA ao NMBN Zn também diminuiu o número de microconídios 4 h-germinados mortos apenas para *F. oxysporum* ($P < 0,05$) (**Figuras 20E, 20F e 21E**). Para os demais tratamentos (microconídios não germinados de *F. solani* e microconídios 4 h-germinados de *F. moniliforme* e *F. solani*), não houve diferença no número de microconídios não germinados e 4 h-germinados mortos, quando comparado com o experimento não lavado ($P > 0,05$). Para todas as espécies de *Fusarium*, a adição de EDTA e azida de sódio ao FS NMBN Zn ocasionou um aumento da sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados, comparado com o experimento no qual foi adicionado apenas azida de sódio (**Figuras 20E, 20F, 21E, 21F, 22E e 22F**).

Figura 20 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados, de *F. oxysporum* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN-Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 6 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de cloreto de zinco; (3) Adição de azida de sódio; (4) Adição de cloreto de zinco e azida de sódio; (5) Adição de EDTA e (6) Adição de EDTA e azida de sódio, antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

Figura 21 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. moniliforme* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 6 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de cloreto de zinco; (3) Adição de azida de sódio; (4) Adição de cloreto de zinco e azida de sódio; (5) Adição de EDTA e (6) Adição de EDTA e azida de sódio, antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

Figura 22 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. solani* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e 4 h-germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 6 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de cloreto de zinco; (3) Adição de azida de sódio; (4) Adição de cloreto de zinco e azida de sódio; (5) Adição de EDTA e (6) Adição de EDTA e azida de sódio, antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

4.6. Avaliação do efeito da IFA na permeabilidade da membrana celular

O efeito da IFA na permeabilidade da membrana celular de microconídios foi avaliado em todas as espécies de *Fusarium*. A permeabilidade da membrana foi avaliada pela interiorização de iodeto de propídio (PI) pela célula. O PI é um composto impermeável à membrana que não é retido dentro de células viáveis e danos na membrana plasmática aumentam a captação de PI pelas células (Hewitt e Nebe-Von-Caron, 2001). Exposições apenas à luz vermelha não alterou a porcentagem de microconídios de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* corados com PI. ($P > 0,05$ para todas as espécies de *Fusarium* e fluências de luz) (**Figuras 23, 24 e 25**). Apenas o tratamento com S137 na ausência de luz, aumentou a porcentagem de microconídios corados com PI. As porcentagens de células coradas foram de 81,5%, 97,3% e 96,8% para os microconídios de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* ($P < 0,05$ para todas as espécies de *Fusarium*). Apesar do aumento na permeabilidade da membrana, o tratamento com S137 matou menos de 7% dos microconídios das três espécies. A IFA com todos os FS e fluências aumentou a permeabilidade da membrana celular dos microconídios das as três espécies de *Fusarium* ($P < 0,05$ para todas as comparações de tratamento). O maior aumento da permeabilidade da membrana foi observado após a IFA com NMBN Zn e S137 (**Figuras 23, 24 e 25**). IFA com MB e TBO aumentou a permeabilidade da membrana de microconídios de *F. solani* (**Figura 27**). A porcentagem de microconídios corados com PI nos controles de morte foi de pelo menos 98% para todas as espécies de *Fusarium* ($P > 0,05$).

Figura 23 – Porcentagem de microconídios corados com PI (coluna cinza) e fração de sobrevivência (quadrado preto) de *F. oxysporum* após a IFA com MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

Figura 24 – Porcentagem de microconídios corados com PI (coluna cinza) e fração de sobrevivência (quadrado preto) de *F. moniliforme* após a IFA com MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

Figura 25 – Porcentagem de microconídios corados com PI (coluna cinza) e fração de sobrevivência (quadrado preto) de *F. solani* após a IFA MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

4.7. Avaliação do efeito da IFA na peroxidação de lipídios de microconídios de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*

As espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante o processo fotoquímico da IFA, como o oxigênio singlete, podem resultar em dano oxidativo de lipídios presentes em microconídios. Nós avaliamos a peroxidação lipídica em microconídios de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* por intermédio da avaliação da produção de malondialdeído (MDA) após a IFA com os FS MB, TBO, NMBN Zn e S137 na fluência de 15 J cm⁻². Exposições apenas à luz vermelha e os tratamentos apenas com os FS na ausência de luz, não aumentaram a peroxidação lipídica em microconídios de qualquer espécie de *Fusarium* ($P > 0,05$ para todas as espécies de *Fusarium*) (**Figura 26**). O aumento da peroxidação lipídica em microconídios de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* foi observado somente após a IFA com NMBN Zn e S137 ($P < 0,05$) (**Figura 26**).

Figura 26 – Peroxidação de lipídios de microconídios avaliados pela formação de malondialdeído (coluna cinza) e fração de sobrevivência (quadrado preto) após a IFA com MB, TBO, NMBN Zn e S137 de: **(A)** *F. oxysporum*, **(B)** *F. moniliforme* e **(C)** *F. solani*. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

4.8. Avaliação do efeito da IFA na carbonilação de proteínas de microconídios de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*

O dano oxidativo de proteínas causado pela IFA em microconídios de *F. oxysporum* pode ser mensurado através da presença de grupos carbonila nas proteínas oxidadas (proteínas carboniladas). Assim, avaliamos a carbonilação de proteínas após tratamentos subletais da IFA. A dose subletal dos FS MB e TBO foi 20 μM de concentração de cada FS e fluência de 10 J cm^{-2} . Para NMBN Zn e S137 foi 2,5 μM de concentração de cada FS e fluência de 5 J cm^{-2} . Os tratamentos apenas com os FS na ausência de luz não aumentaram a carbonilação de proteínas em microconídios de *F. oxysporum* ($P > 0,05$) (**Figura 27**). A IFA com todos os FS com as fluências aumentou a carbonilação de proteínas dos microconídios de *F. oxysporum* ($P < 0,05$ para todas as comparações de tratamento) (**Figura 27**).

Figura 27 – Carbonilação de proteínas de microconídios não germinados de *F. oxysporum*, avaliados pela formação de grupos carbonilas de dinitrofenil (DNP) hidrazona (coluna cinza) e fração de sobrevivência (quadrado preto) após a IFA com MB, TBO, NMBN Zn e S137. Cada valor é a média de 2 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

4.9. Efeito da IFA na fragmentação do núcleo de microconídios não germinados e 4 h-germinados de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*

Durante o processo de morte celular um dos eventos mais importante é a fragmentação do núcleo. EROs podem causar danos irreversíveis no DNA da célula levando a fragmentação do DNA (Jena, 2012). Assim, avaliamos a fragmentação do núcleo após a IFA utilizando uma solução hipotônica fluorescente contendo o fluorocromo PI, que é capaz de se ligar e marcar o DNA da célula. A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para diferenciar células que sofreram dano no DNA (DNA fragmentado), de células com DNA não fragmentado (Nicoletti *et al.*, 1991 e Riccardi e Nicoletti 2006). Tratamentos apenas com o FS (MB, TBO e NMBN Zn) não aumentaram a porcentagem de células com fragmentação do núcleo para os microconídios não germinados e 4 h-germinados. Apenas o S137 teve um aumento na porcentagem de células com fragmentação de núcleo sem a exposição à luz. As porcentagens de células com fragmentação do núcleo foram de 25%, 22,3% e 35% para os microconídios não germinados e de 68%, 54,8% e 79,8% para os microconídios 4 h-germinados de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani* ($P < 0,05$, para todas as espécies de *Fusarium*) (**Figura 28 e 29**). A IFA utilizando microconídios não germinados aumentou a porcentagem de células com fragmentação de núcleo apenas para o FS S137 e fluências de 10 e 15 J cm⁻² ($P < 0,05$, para todas as espécies de *Fusarium*). A IFA utilizando microconídios 4 h-germinados e fluência de 10 J cm⁻² aumentou a porcentagem de células com fragmentação do núcleo para o FS S137 em todas as espécies de *Fusarium*. Igualmente para o FS NMBN Zn nas espécies *F. moniliforme* e *F. solani*. A IFA utilizando microconídios 4 h-germinados e fluência de 15 J cm⁻² aumentou a porcentagem de células com fragmentação de núcleo para o FS MB para as espécies *F. oxysporum* e *F. solani* ($P < 0,05$). Para o FS TBO o aumento foi observado apenas para *F. solani* ($P < 0,05$). E para os FS NMBN Zn e S137, para todas as espécies de *Fusarium* ($P < 0,05$) (**Figura 28 e 29**).

Figura 28 – Fragmentação do núcleo de microconídios não germinados avaliados pela técnica de *Hypotonic fluorescent solution-HFS* (coluna cinza) e fração de sobrevivência (quadrado preto) após a IFA com MB, TBO, NMBN Zn e S137 de: (A) *F. oxysporum*, (B) *F. moniliforme* e (C) *F. solani*. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

Figura 29 – Fragmentação do núcleo de microconídios 4 h-germinados avaliados pela técnica de *Hypotonic fluorescent solution-HFS* (coluna cinza) e fração de sobrevivência (quadrado preto) após a IFA com MB, TBO, NMBN Zn e S137 de: (A) *F. oxysporum*, (B) *F. moniliforme* e (C) *F. solani*. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

4.10. Avaliação da virulência das espécies de *Fusarium* utilizando o modelo invertebrado *Galleria mellonella*

O modelo invertebrado *G. mellonella* foi utilizado para avaliar o perfil de virulência das espécies *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*. Inicialmente foi feita uma análise para padronizar a melhor condição para o teste de virulências, onde diferentes concentrações de microconídios (2×10^8 , 2×10^7 , 2×10^6 , 2×10^5 e 2×10^4 microconídios mL^{-1}) foram inoculadas por infecção artificial em larvas do inseto. Nós observamos que a concentração de microconídios mais adequada para ensaios de virulência com estas espécies de *Fusarium* é 2×10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) para *F. oxysporum* e *F. moniliforme* e 2×10^7 UFC para *F. solani*. Nestas concentrações de microconídios as larvas não morreram nos primeiros dias do experimento possibilitando o acompanhamento do experimento por um período até de aproximadamente 8 dias (**Figura 30**).

Figura 30 – Taxa de sobreviventes de larvas de *G. mellonella* após infecção com diferentes concentrações de microconídios (2×10^8 , 2×10^7 , 2×10^6 , 2×10^5 e 2×10^4 células mL^{-1}) de *F. oxysporum* (A), *F. moniliforme* (B), *F. solani* (C). Inoculação de larvas com tampão PBS foi usada como controle de sobrevivência.

4.11. Efeito da IFA com os fotossensibilizadores fenotiazínicos na sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com microconídios de *F. moniliforme*

O efeito da IFA com os FS fenotiazínicos MB, TBO, NMBN Zn e S137 em larvas de *G. mellonella* infectadas artificialmente com microconídios de *F. moniliforme* é mostrado na **Figura 31**. Foram feitos grupos controles, onde as larvas foram inoculadas apenas com PBS, controle no qual foram feitas exposições das larvas apenas à luz vermelha (efeito da luz), controle no qual foi feito o tratamento da larva no somente com a inoculação dos FS MB, TBO, NMBN, NMBN Zn e S137 (toxicidade no escuro) e inoculação das larvas com os FS (MB, TBO, NMBN, NMBN Zn e S137) seguida de exposição à luz vermelha. Estes controles não apresentaram o mesmo perfil de morte das larvas de *G. mellonella* comparando com larvas infectadas artificialmente com microconídios de *F. moniliforme* (**Figura 31**). O FS que apresentou o melhor efeito no atraso da morte das larvas de *G. mellonella* foi o TBO (**Figura 31C e 31D**). Embora a IFA com os FS NMBN Zn e S137 apresentou atraso na morte das larvas, esse atraso também foi observado no controle onde foi feita a inoculação das larvas com os FS (NMBN Zn e S137) e a infecção artificial com os microconídios sem a exposição à luz (**Figura 31E e 31F**, para NMBN Zn e **Figura 31G e 31H**, para S137). A IFA com o FS MB não teve nenhum efeito no atraso da morte das larvas (**Figura 31A e 31B**).

Figura 31 – Efeito da IFA com os FS MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F) e S137 (G e H) em larvas de *G. mellonella* infectadas com *F. moniliforme*. Inoculação de larvas com tampão PBS foi usada como controle de sobrevivência.

5. Discussão

As últimas décadas vêm sendo marcadas por avanços na medicina que levaram ao aumento da expectativa de vida, além de terapia imunossupressora, quimioterapia e o advento de infecções virais como o HIV. Estes eventos estão concomitantemente levando ao aumento no número de infecções localizadas e invasivas, com altos índices de mortalidade, causadas por fungos, entre eles os pertencentes ao gênero *Fusarium* (Ishida *et al.*, 2012). As infecções fúngicas causadas pelas espécies de *Fusarium* são difíceis de tratar devido às limitações terapêuticas relacionadas à resistência do fungo a praticamente todos os antifúngicos habitualmente utilizados (Pincelli *et al.*, 2008; Wiederhold *et al.*, 2010). Desse modo, é promissor o estudo de novas abordagens terapêuticas antifúngicas, que apresentam multiplicidade de alvos. A IFA é uma técnica que apresenta um amplo espectro de ação devido à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente o oxigênio singleto, que são capazes de oxidar qualquer biomolécula (Dai *et al.*, 2012).

No presente trabalho, foi avaliada a eficácia da IFA com diversos FS fenotiazínicos na inativação de microconídios não germinados e germinados de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*. Ao contrário dos antifúngicos convencionais, o mecanismo de ação da IFA apresenta uma perspectiva diferente de ação antimicrobiana. Assim, além da seletividade dos FS aos microrganismos (característica essencial para qualquer antimicrobiano), a absorção de luz deve ser incluída como um componente essencial para que, em conjunto com o FS, ocorra a morte da célula microbiana por meio da produção de EROs (Wainwright e McLean, 2016). Os FS, como os fenotiazínicos MB, TBO, NMBN, NMBN Zn e S137, são moléculas compostas por duas partes: o cromóforo (sistema de anel oxidado) e modificações periféricas (cadeias laterais, auxocromo), além de, adicionalmente, a molécula de cloreto de zinco encontrada na formulação do NMBN Zn e o ânion hidrogenossulfato (HSO_4^-) na formulação do S137. Estas alterações nas estruturas dos FS conferem diferentes propriedades de absorção/emissão, produção de oxigênio singleto, solubilidade e lipofilicidade, que afetam tanto a sua distribuição quanto a sua absorção pelo microrganismo (Wainwright e Giddens, 2003). Um dos fundamentos da IFA consiste na produção de uma população suficiente de moléculas no estado excitado tripleto para que ocorra a produção de EROs e, por consequência, ocorra a inativação do microrganismo (Wainwright e McLean, 2016). A produção de moléculas com alto rendimento quântico de estado excitado tripleto e com tempo de vida do estado excitado tripleto mais longo é facilitada pela complexação dos FS com íons metálicos, como Zn^{2+} , Al^{3+} e Ga^{3+} (Idowu; Nyokong, 2007 e 2008; Wang *et al.*, 2014). Assim, quanto maior a população de FS no estado tripleto, maior é a probabilidade da transferência

da energia do FS para o oxigênio presente no meio, e com isso uma maior produção de oxigênio singlete (Oliveira *et al.*, 2009). Adicionalmente, a capacidade do FS em absorver luz é um importante fator que influencia diretamente na concentração do FS e na potência da luz a serem utilizadas na IFA. Valores altos de coeficiente de absortividade molar (ϵ) facilitam o início dos processos radiativos e não radiativos ligados à produção de EROs durante a IFA (Detty, Gibson, e Wagner; 2004; Castano, Demidova e Hamblin, 2005). Os FS MB, TBO, NMBN, NMBN Zn e S137 demonstram ser bons produtores de oxigênio singlete pois, neste trabalho, através da oxidação do DPBF pelo próprio oxigênio singlete, foi possível medir indiretamente o rendimento quântico de oxigênio singlete produzido durante a IFA. Além disso, entre os FS testados, o NMBN Zn foi o FS que apresentou a maior eficiência na produção de oxigênio singlete nas condições estudadas, podendo ser relacionada a um maior tempo de vida do estado excitado tripleto do FS devido a presença do íon metálico zinco em sua formulação, que por consequência aumentou a eficiência na geração de oxigênio singlete (Bell e MacGillivray, 1974; Foote, 1979; De Paula *et al.*, 2010). Como mencionado anteriormente, a complexação de FS com íons metálicos possivelmente pode aumentar a produção de oxigênio singlete. Assim, com o intuito de avaliar o efeito do zinco na produção de oxigênio singlete em FS fenotiazínicos, nós adicionamos cloreto de zinco nas soluções dos FS MB, TBO, NMBN e S137. Foi verificado que a adição de cloreto de zinco aumentou o valor do rendimento quântico de oxigênio singlete, aqui estimado através da degradação do DPBF. Assim, podemos supor que o aumento do rendimento quântico de oxigênio singlete se deu devido a um aumento do tempo de vida no estado tripleto excitado dos FS causado pela presença do íon metálico zinco.

A seletividade do FS pela célula e a consequente eficácia da IFA são influenciadas por diversas características, incluindo o tamanho da célula, característica morfológica e físico-química da parede celular e da membrana celular, o metabolismo da célula, e as características físico-químicas do FS (Paardekooper *et al.*, 1992; Usacheva *et al.*, 2001; Usacheva *et al.*, 2003; Hamblin e Hasan, 2004; Demidova e Hamblin, 2005b; Jori, 2006; Fuchs *et al.*, 2007; Smijs *et al.*, 2007; Smijs *et al.*, 2008; Usacheva *et al.*, 2008). Assim, a morfologia e principalmente a fase do ciclo celular em que a célula fúngica está situada no momento da IFA são importantes fatores a serem avaliados. A germinação de conídios e microconídios pode ser dividida em três estágios. O primeiro é a ativação de conídios quiescentes, por fatores ambientais adequados, tais como nutrientes exógenos de baixo peso molecular, como açúcares e aminoácidos. Esta ativação é seguida (segundo estágio) de crescimento isotrópico, que é a primeira alteração morfológica que pode ser observada

durante a germinação de conídios e envolve a absorção de água e crescimento da parede celular. O crescimento isotrópico ocorre simultaneamente com a retomada das inúmeras atividades metabólicas, incluindo a respiração, síntese de RNA e proteína, que resulta em uma célula com o diâmetro de duas a várias vezes maior se comparado com o conídio em repouso (quiescente). A última etapa é o crescimento polarizado, que termina com a formação do tubo germinativo (Braga, Destéfano e Messias, 1999; Lledías, Rangel e Hansberg, 1999; Oh *et al.*, 2010). Após 4 horas de incubação em meio de cultura, os microconídios de todas as três espécies de *Fusarium* apresentam o crescimento isotrópico, ausência da duplicação nuclear, ausência do tubo germinativo e metabolismo duas vezes mais ativo que os microconídios não germinados, caracterizando assim, a segunda fase da germinação.

O estudo da atividade metabólica em que os microconídios se encontram é complementado pelo estudo das condições ótimas para a IFA em microrganismos. Os parâmetros mais apropriados para a IFA foram estabelecidos por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Esse tipo de abordagem foi muito conveniente, pois permitiu avaliar um grande número de tratamentos como os efeitos dos diversos FS, em várias concentrações, utilizando-se diferentes fluências, nas diferentes espécies de *Fusarium*. Os FS mais efetivos e, portanto, com menores valores de CIM para *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*, foram o NMBN Zn e o S137. O melhor desempenho de NMBN Zn e S137, em comparação com outros FS fenotiazínicos, também foi observado *in vitro* para os fungos patogênicos humanos *Candida* spp., *Trichophyton* spp. e para o fungo fitopatogênico *Colletotrichum* spp. (Rodrigues *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2013; De Menezes *et al.*, 2014b).

Após o estabelecimento das melhores condições para a IFA através dos experimentos baseados na CIM, nós avaliamos o efeito da IFA com todos os FS (MB, TBO, NMBN, NMBN Zn e S137) na sobrevivência de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*, utilizando os respectivos microconídios não germinados e 4 h-germinados. A IFA foi muito eficiente para matar tanto os microconídios não germinados, quanto como para matar os microconídios 4 h-germinados das três espécies de *Fusarium*.

Tratamentos com NMBN Zn e luz vermelha (15 J cm^{-2}) resultaram em aproximadamente 5-log de redução na sobrevivência de microconídios não germinado e 4 h-germinado, isto é, a morte de 99,999% de microconídios. A IFA com S137 também resultou na mesma redução da sobrevivência (5-log) para os microconídios, não germinado e 4 h-germinado, de *F. oxysporum* e *F. solani*. Entretanto, para *F. moniliforme* a IFA com S137, resultou em aproximadamente 3-log de redução na sobrevivência (99,9% de morte) dos

microconídios, não germinado e 4 h-germinado. Gonzales e colaboradores (2010) descrevem que a composição química, a carga eletrostática e a hidrofobicidade da parede celular diferem muito entre diferentes fases do desenvolvimento e entre diferentes espécies, influenciando na seletividade e na eficácia dos diferentes FS. Possivelmente, a espécie *F. moniliforme* apresenta alguma característica diferente na composição da parede celular que pode ter contribuído para a redução do efeito da IFA.

O estudo da interação/absorção dos diferentes FS com os microconídios não germinados e 4 h-germinados, mostrou que a interação do FS com o fungo é dependente do FS, bem como do estágio de germinação em que o microconídio se encontra. A lavagem dos microconídios não germinados para a remoção dos FS que não entraram ou não está fortemente aderidos à superfície dos microconídios, antes da exposição de luz, reduziu o efeito da IFA com os FS fenotiazínicos. No entanto, a redução foi menor para S137 e para a fluência de 15 J cm^{-2} para NMBN Zn. Gonzales e colaboradores (2010) reportaram a IFA de conídios de *A. nidulans* e do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* com os FS MB e TBO. Neste estudo, a lavagem para a retirada do FS não ligado reduziu a IFA de *A. nidulans*, mas teve um efeito muito menor em *M. anisopliae*, o que indica que os conídios das duas espécies interagem de maneira diferente com os FS. Nós observamos por meio de microcopia que os FS TBO e NMBN Zn entraram e acumularam em estruturas presentes no citoplasma dos microconídios não germinados de todas as três espécies de *Fusarium*. Ao contrário do que foi observado nos microconídios não germinados, a lavagem dos microconídios 4 h-germinados das três espécies de *Fusarium* não reduziu o efeito da IFA (na fluência de 15 J cm^{-2}) com todos os FS. Após a germinação dos microconídios, nós observamos a entrada e acúmulo de MB, TBO e NMBN Zn em estruturas presentes no citoplasma dos microconídios 4 h-germinados de todas as três espécies de *Fusarium*. As características estruturais e físico-químicas (por exemplo, composição química, carga eletrostática e hidrofobicidade) da parede celular diferem muito entre diferentes fases do desenvolvimento e entre diferentes espécies (Gonzales *et al.*, 2010). Diferença na carga eletrostática e mudança na hidrofobicidade da parede celular podem explicar a diferença encontrada na interação dos FS pelos microconídios nos diferentes estágios de germinação avaliados.

O acúmulo do FS dentro dos microconídios das espécies de *Fusarium* foi observado em estruturas semelhantes a vacúolos. A coloração das membranas dos microconídios não germinados e 4 h-germinados com o corante lipofílico FM4-64[®], indicou que as estruturas presentes no citoplasma, onde os FS possivelmente estão presentes, são vacúolos, uma vez que as membranas marcadas pelo corante lipofílico são semelhantes às estruturas onde os FS

estão acumulados. Curiosamente, também foi observada a presença de grandes vacúolos no citoplasma dos microconídios germinados de *F. oxysporum* e *F. solani* tratados com o FS fenotiazínico S137. Os vacúolos são estruturas particularmente importantes nas fases iniciais da germinação, tendo um papel na regulação osmótica, transporte de proteínas e armazenamento de lipídios (Klionsky, *et al.*, 1990; Kane, *et al.*, 2006; Veses, *et al.*, 2008; Kim, *et al.*, 2015). A presença de grandes vacúolos também foi observada no citoplasma de conídios do fungo fitopatogênico *C. acutatum* tratado com o mesmo FS (De Menezes, *et al.*, 2014b). Assim, a maior toxicidade no escuro do FS S137 pode ser a causa da desorganização dos vacúolos, gerando grandes vacúolos no citoplasma.

A análise da interação e a localização dos FS nos microconídios 4 h-germinados e não germinados é importante para a compreensão dos mecanismos envolvidos na IFA, já que os danos provocados pelas EROs estão limitados às moléculas e/ou estruturas adjacentes aos FS. A carga da parede celular e membrana citoplasmática são fatores que influenciam na internalização do FS na célula e, conseqüentemente, na sua distribuição. Tanto a parede celular quanto a membrana plasmática são carregadas negativamente, o que favorece a interação de FS catiônicos, como os fenotiazínicos (MB, TBO, NMBN Zn e S137) (Bacellar *et al.*, 2014; De Menezes, *et al.*, 2014b). Tijssen e colaboradores (1981) descreveram que o TBO liga-se instantaneamente a polifosfatos localizados no lado externo na membrana plasmática de *Saccharomyces fragilis*. Smijs e colaboradores (2009) observaram danos severos na parede celular e deformações, tanto em microconídios como em hifas de *Trichophyton rubrum* após a IFA com o FS catiônico Sylsens B. O efeito fungicida ocorreu após a ligação da porfirina, positivamente carregada, com a superfície externa da parede celular, que é negativamente carregada.

A maioria dos antifúngicos e fungicidas utilizados atua apenas em células metabolicamente ativas e/ou apenas impedem o desenvolvimento do fungo (efeito fungistático). Já a IFA com os FS fenotiazínicos conseguiu matar tanto microconídios quiescentes não germinados quanto os 4 h-germinados (metabolicamente ativos), de todas as espécies de *Fusarium* estudadas. É importante salientar que a redução do inóculo inicial está entre as estratégias utilizadas para o controle de doenças causadas por espécies de *Fusarium* (Sharma, Singh e Singh, 2009; Koike e Gordon, 2015; McGovern, 2015; Gordon, Swett e Wingfield, 2015). Assim, o uso da IFA para matar microconídios quiescentes de *Fusarium* spp. em sementes, plântulas, frutas e legumes, pode reduzir consideravelmente o número de microconídios viáveis (inóculo) na área tratada.

O modo de ação da IFA ocorre por meio da oxidação inespecífica de diversos alvos celulares (de Souza *et al.*, 2006). Dentre as EROs que causam esta oxidação, estão a hidroxila radicalar e o oxigênio singleto, capazes de matar ou inativar as células-alvo (Oliveira, Machado e Pessine, 2005). A hidroxila radicalar ($\cdot\text{OH}$) é produzida a partir da quebra do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Chen e Schopfer, 1999). O H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\cdot-}$ são produzidos pelas reações do tipo I, nas quais as moléculas do FS, quando ativadas pela luz, reagem com moléculas vizinhas e/ou com o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$), por transferência direta de elétrons (Chen e Schopfer, 1999; Castano, Demidova e Hamblin, 2004; Allison e Moghissi, 2013), tornando, assim, a $\cdot\text{OH}$ a espécie reativa mais importante da IFA produzida a partir das reações do tipo I. Nós avaliamos o efeito da $\cdot\text{OH}$ na IFA pela adição de D-manitol, que é um antioxidante específico da $\cdot\text{OH}$ (Desensso, Scialli e Goeringer, 1994). A adição de manitol não preveniu a morte dos microconídios não germinado e 4 h-germinado das três espécies de *Fusarium*. Este resultado já era esperado, visto que diversos trabalhos descrevem que a $\cdot\text{OH}$ não é a principal espécie responsável pela inativação dos microconídios não germinado e 4 h-germinado, mediada pela IFA induzida por FS fenotiazínicos (Wainwright *et al.*, 1998; Bacellar *et al.*, 2014).

O oxigênio singleto é uma EROs produzida na reação do tipo II, nas quais as moléculas dos FS, quando ativadas pela luz, transferem a energia diretamente ao oxigênio molecular, transformando-o em oxigênio singleto que é altamente oxidante (Chen e Schopfer, 1999; Castano, Demidova e Hamblin, 2004; Allison e Moghissi, 2013). Para evidenciar a importância do oxigênio singleto na IFA, foram feitos experimentos com a adição de 10 mM de azida de sódio previamente a IFA. A azida de sódio é uma molécula supressora de oxigênio singleto, que pode ser utilizada para demonstrar a presença desta EROs. A azida de sódio reage rapidamente com o oxigênio singleto, liberando radicais azidila. Estes são formados devido à dissociação de um complexo de transferência de carga formado durante a supressão do oxigênio singleto (Foote, 1979; Harbour e Issler, 1982). Os resultados evidenciaram que a azida de sódio reduziu consideravelmente a mortalidade dos microconídios não germinados e 4 h-germinados das três espécies de *Fusarium*, para os FS MB, TBO, NMBN Zn e S137. Portanto, é possível afirmar que o oxigênio singleto é ao menos um dos principais responsáveis pelo processo de fotossensibilização realizados neste trabalho.

Apesar da adição de azida de sódio diminuir o efeito da IFA para todos os FS em todas as espécies de *Fusarium* aqui estudadas, o NMBN Zn apresentou menor efeito para a fluência de 15 J cm^{-2} , isto é, reduções de no mínimo 2-log para os microconídios não germinados e 4

h-germinados das três espécies de *Fusarium*. É importante observar que o efeito encontrado pode estar relacionado à natureza altamente reativa do oxigênio singleto, que possui um raio de ação estimado de 0,01 a 0,02 μm , correspondendo a um tempo de vida estimado de 0,01 a 0,04 μs em sistemas biológicos, significando que o dano fotodinâmico causado pela formação do oxigênio singleto ocorre próximo à localização do FS durante a irradiação (Machado, 2000; Nagata *et al.*, 2003; Juzeniene e Moan, 2007). Podemos especular que a azida de sódio foi incapaz de sequestrar todo o oxigênio singleto gerado pelo FS NMBN Zn, que se encontra no interior dos microconídios não germinado e 4 h-germinado, interagindo fortemente com estruturas vacuolares presentes no citoplasma, como foi visto pelos estudos microscópicos realizados. Para avaliar o efeito do oxigênio singleto que foi produzido no interior dos microconídios, foi utilizada a glutathione (GSH), um tripeptídeo considerado a primeira linha de defesa das células contra EROs (Monea *et al.*, 2014; Sreeram, Suryakar e Dani, 2015). Como a GSH é um antioxidante encontrado naturalmente em células, altas concentrações de GSH não inibem o desenvolvimento do fungo, diferente do que ocorre com a adição de altas concentrações de azida de sódio. A adição de 10 mM de GSH inibiu completamente o efeito da IFA com os FS MB, TBO, NMBN, NMBN Zn e S137 em microconídios não germinados e 4 h-germinados de todas as espécies de *Fusarium* avaliadas.

FS que possuem íons metálicos na sua formulação, como Zn^{2+} , Al^{3+} e Ga^{3+} , geralmente possuem um alto rendimento quântico do estado excitado tripleto e com tempo de vida do estado excitado tripleto mais longo (Idowu e Nyokong, 2007 e 2008; Wang *et al.*, 2014). Neste trabalho, observamos que a presença de zinco no FS NMBN Zn aumentou o rendimento quântico de oxigênio singleto. Aqui, verificamos que a adição do cloreto de zinco aos FS aumenta a produção de oxigênio singleto e estudamos este efeito nas três espécies de *Fusarium*. Para tal, adicionamos aos experimentos azida de sódio para avaliar se o zinco alterou alguma característica dos FS testados. Os resultados mostraram que quando o zinco (FS + cloreto de zinco e azida de sódio) foi adicionado, houve um aumento na morte dos microconídios não germinados e 4 h-germinados de todas as espécies de *Fusarium* estudadas, se comparados com o experimento em que foi adicionado apenas azida de sódio. Este resultado pode estar relacionado com as alterações descritas por Pashkovskaya e colaboradores (2007), como a alteração da hidrofobicidade dos compostos, influenciando no possível aumento de afinidade dos FS com zinco por membranas biológicas, dificultando a supressão do oxigênio singleto pela azida de sódio. Além disso, para adicionalmente avaliar a importância do zinco, foram realizados experimentos com o quelante EDTA e azida de sódio na solução do FS comercial que já possuía o zinco na sua composição (NMBN Zn). A eficácia

da IFA diminuiu para todos os tratamentos com as três espécies de *Fusarium*. Esse efeito pode estar relacionado com o fato de que o EDTA é um forte sequestrador (quelante) de metais e pode dificultar a interação do FS que já possui o zinco na sua formulação nativa com os microconídios não germinados e 4 h-germinados de *Fusarium* spp. A avaliação da interação do zinco com os FS foi muito promissora. Porém, ainda são necessários estudos para investigar a estabilidade dos FS com cloreto de zinco, avaliar o tempo de vida no estado excitado, bem como o rendimento quântico de fluorescência dos FS com cloreto de zinco, e realizar estudo de ressonância magnética nuclear (RMN) para investigar de que forma o zinco está interagindo com as moléculas dos FS estudados.

Vários estudos têm demonstrado que a membrana celular é um dos alvos das EROs geradas durante o processo fotodinâmico (Paardekooper *et al.*, 1993; Rokitskaya *et al.*, 2000; Ben-Dror *et al.*, 2006; Pavani *et al.*, 2009; Cordeiro, Miotto e Batista, 2012). O PI é amplamente utilizado para avaliar a integridade da membrana celular (Hewitt e Nebe-Von-Caron, 2001; Rosseti, Chagas e Costa, 2014). A IFA com todos os FS aumentou a permeabilidade da membrana de microconídios das três espécies de *Fusarium*. Ito e colaboradores (1977) demonstraram que os FS TBO e eosina Y afetam a membrana celular de *S. cerevisiae*, atribuindo a morte do microrganismo aos danos causados pelos FS na membrana. Apenas o tratamento com o FS S137 aumentou a permeabilidade da membrana celular no escuro, apesar disso, a viabilidade dos microconídios das três espécies permaneceu acima de 95%. O aumento da permeabilidade da membrana sem causar a morte celular também foi observado em *S. cerevisiae* (Davey e Hexley, 2011). Uma possível explicação do aumento da permeabilidade da membrana celular observada após o tratamento com S137 sem exposição à luz (escuro) estaria relacionada à maior lipofilicidade do FS S137, em comparação com os outros compostos estudados (Wainwright, 2005; Vorobey e Pinchuk, 2008; Noodt *et al.*, 2011). A maior afinidade por lipídios apresentada pelos FS S137 e NMBN Zn facilita a interação destes FS com as membranas celulares e, conseqüentemente, o aumento da oxidação dos seus lipídios durante a IFA. Como esperado, a IFA com NMBN Zn e S137 aumentou a peroxidação lipídica em todas as espécies de *Fusarium*. Um estudo anterior mostrou um aumento na peroxidação lipídica após o tratamento fotodinâmico de conídios de *F. poae* e *F. culmorum*, utilizando o FS lipofílico protoporfirina IX (Vorobey e Pinchuk, 2008).

Apesar dos lipídeos, especialmente aqueles da membrana plasmática, estarem entre os principais alvos da IFA (Böcking *et al.*, 2000; Lambrechts, Aaldres e Van Marle, 2005), o dano à proteína tem também um papel importante, principalmente em função de sua

abundância na célula e suas constantes de reação com o oxigênio singlete (Davies, 2003). O dano oxidativo em proteínas de microconídios de *F. oxysporum* induzido pela IFA, aqui demonstrado pelos valores de proteínas carboniladas, foram obtidos a partir de experimentos com doses subletais da IFA, uma vez que danos induzidos por IFA em doses letais diminuiriam drasticamente o conteúdo proteico (dados não mostrados), prejudicando as análises de dano oxidativo em proteínas. É coerente supor que a oxidação de múltiplos alvos pelo oxigênio singlete em uma proteína possa formar agregação proteica durante a IFA. Essa agregação já foi descrita e inicia-se na ligação cruzada entre proteínas que possuem histidina (His) oxidada, ligando-se covalentemente entre grupos amino de outros aminoácidos. Essas ligações podem ser do tipo His-His e His-Lys, podendo ocorrer intra e intermolecularmente (Shen *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2014). Essa pode ser uma das causas da dificuldade encontrada em fazer as análises de oxidação de proteínas na IFA em dose letal. Os resultados obtidos a partir da IFA em doses subletais demonstraram que todos os FS testados (MB, TBO, NMBN Zn e S137) conseguiram gerar carbonilação das proteínas dos microconídios do *F. oxysporum*. A carbonilação pode estar relacionada aos danos causados pela $\cdot\text{OH}^-$, que possui como alvos as cadeias laterais dos aminoácidos lisina e arginina (Lys e Arg) (Requena *et al.*, 2001). Esse dano oxidativo culmina na formação de dois semialdeídos e isso envolve a eliminação de grupos amina e guanidina. A proteína resultante torna-se mais ácida, favorecendo a formação de grupos carbonila (Davies, 1987; Headlam e Davies 2004). Cadeias laterais de aminoácidos alifáticos como alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu) e aspartato (Asp), também conseguem reagir com a $\cdot\text{OH}^-$, resultando na formação de grupos carbonila (Headlam *et al.*, 2000; Headlam e Davies 2002). Este tipo de dano já foi descrito por Davies (1987) após oxidação de proteínas por γ -radiólise. Contudo, é necessário lembrar que a IFA com os FS fenotiazínicos geram majoritariamente oxigênio singlete (Wainwright *et al.*, 1998), que por sua vez reage preferencialmente com os aminoácidos triptofano (Trip), His, tirosina (Tyr), metionina (Met) e cisteína (Cys), favorecendo a formação de grupos carbonila (Weil; Gordon; Buchert, 1951).

Outra biomolécula que deve ser considerada alvo de danos relacionados às espécies reativas produzidas durante a IFA é o DNA. Em levedura, os FS laranja de acridina e os psoralenos causam danos no DNA (Ito, 1973; Ito *et al.*, 1977). Nós utilizamos uma solução hipotônica fluorescente para avaliar danos no DNA de microconídios não germinados e 4 h-germinados das três espécies de *Fusarium* estudadas, na IFA com os FS MB, TBO, NMBN Zn e S137. Apenas a IFA com o S137 fragmentou o DNA dos microconídios não geminados e 4 h-germinados em todas as fluências (10 e 15 J cm^{-2}) e espécies testadas. Para os FS MB,

TBO e NMBN Zn, a fragmentação do DNA após a IFA foi observada apenas em microconídios 4 h germinados. Na menor fluência (10 J cm^{-2}), a fragmentação do DNA foi observada para *F. moniliforme* e *F. solani* (Tratamento com NMBN Zn). Para a maior fluência (15 J cm^{-2}), a fragmentação do DNA foi observada para *F. oxysporum* (Tratamentos com MB e NMBN Zn), *F. moniliforme* (Tratamentos com TBO e NMBN Zn) e *F. solani* (Tratamentos com MB, TBO e NMBN Zn). O FS S137 foi o único que apresentou um aumento na fragmentação do DNA sem a exposição à luz. Isso pode ser explicado pela presença do ânion hidrogenossulfato (HSO_4^-), utilizado para dar estabilidade à molécula deste FS. O ânion hidrogenossulfato pode causar lesões ao DNA semelhantes às causadas pelas espécies reativas, radical ânion sulfato ($\cdot\text{SO}_4^-$) e a $\cdot\text{OH}^-$ (Aravidakummar *et al.*, 2003; Luke *et al.*, 2003).

O uso de invertebrados em ensaios de virulência de microrganismos tem aumentado nas últimas décadas devido a sua alta similaridade das células imunes inatas de mamíferos. Os hemócitos de invertebrados podem servir como um método de triagem para ensaios de virulência e, com isso, diminuir o uso excessivo de mamíferos (camundongos e ratos) como modelos de virulência (Desalermos, Fuchs e Mylonakis, 2012). O invertebrado *Galleria mellonella* é uma espécie de inseto da ordem Lepidoptera, pertencente à família *Pyrilidae*. *G. mellonella* e tem uma vasta distribuição geográfica de ocorrência natural em colmeias, alimentando-se de cera, pólen e mel. O período de desenvolvimento da larva é de aproximadamente 40 dias. O uso de *G. mellonella* em ensaios de virulência já foi descrito para os fungos *C. albicans*, *C. neoformans*, *A. fumigatus*, *A. flavus* e *F. oxysporum* (Bernnan *et al.*, 2002; Revees *et al.*, 2004; Desalermos, Fuchs e Mylonakis, 2012). Foi constatado que *G. mellonella* é um ótimo modelo para verificação da virulência de espécies de *Fusarium*, sendo que *F. moniliforme* foi mais virulento seguido de *F. oxysporum* e *F. solani*. Informações a respeito da IFA de microrganismos patogênicos utilizando *G. mellonella* como modelo de estudo *in vivo* são extremamente limitadas. A IFA com o MB e luz vermelha prolonga significativamente a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com o fungo leveduriforme *C. albicans* e a bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecium*, quando comparadas com controles não tratados com a IFA (Chibebe Junior *et al.*, 2013a,b). Neste trabalho, nós avaliamos o efeito da IFA com os FS MB, TBO, NMBN Zn e S137 na sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com microconídios de *F. moniliforme* (espécie mais virulenta). O TBO foi o FS que mais prolongou a sobrevivência das larvas de *G. mellonella* nas condições estudadas. Esse foi o primeiro trabalho que avaliou *in vivo* o

efeito da IFA com os FS MB, TBO, NMBN Zn e S137 em larvas de *G. mellonella* infectadas com o fungo filamentoso *F. moniliforme*.

A IFA com os FS fenotiazínicos foi muito eficiente para matar os microconídios não germinados (quiescentes) e 4 h-germinados (metabolicamente ativos) de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Desse modo, a IFA tem grande potencial para reduzir o inóculo de *Fusarium* em qualquer ambiente, seja para o controle de onicomicoses oportunistas, ou para o uso na desinfecção de sementes, plântulas frutas e verduras, abrindo assim, a perspectiva do uso da IFA com os FS fenotiazínicos MB, TBO, NMBN Zn e S137 no controle da colonização e de doenças causadas por *Fusarium*.

6. Conclusão

O presente trabalho apresentou os resultados da IFA com FS fenotiazínicos em microconídios de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*. Os dados confirmam a eficácia dos FS fenotiazínicos na inativação fotodinâmica tanto em microconídios quiescentes (não germinados) e metabolicamente ativos após 4 h de germinação, das espécies de *Fusarium* testadas. Também foi possível observar que os FS fenotiazínicos possuem múltiplos alvos, como lipídeos, proteínas e material genético, nas estruturas estudadas (microconídios não germinados e 4 h-germinado). Além disso, foi observado que cada FS interage de forma diferente com cada alvo avaliado. Os nossos resultados sugerem que a síntese de novos derivados de fenotiazínicos que inclua o zinco na molécula é muito promissora e deve ser mais explorada.

Devido à multiplicidade de alvos a IFA, o risco de seleção de linhagens tolerantes torna-se baixo fazendo com que a IFA possa ser utilizada como uma alternativa viável para o controle do inóculo das espécies de *Fusarium*. Este controle pode ser feito tanto em infecções superficiais (onicomicoses e dermatoses) em humanos e animais, como no controle desse microrganismo em sementes, plântulas, frutas e legumes. Entretanto, mais estudos deverão ser feitos para avaliar o efeito da IFA em modelo animal, em plantas e bem como na clínica, além de melhorar a formulação dos FS para que possam ser estabelecidas condições seguras para aplicação da IFA em animais, humanos e plantas.

7. Referências bibliográficas

- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MONZÓN, A.; MELLADO, E.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. Isolates identified by molecular methods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 805-809, 2008.
- ALI, H.; van LIER, J. E. Metal complexes as photo and radiosensitizers. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 2379-2460, 1999.
- ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. **Clinical Endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 24-33, 2013.
- ALMEIDA, L. M.; ZANOELO, F. F.; CASTRO, K. P.; BORISSEVITCH, I. E.; SOARES C. M.; GONÇALVES, P. J. Cell survival and altered gene expression following photodynamic inactivation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 4, p. 992-1000, 2012.
- ARAVINDAKUMAR, C. T.; SCHUCHMANN, M. N.; RAO, B. S. M.; von SONNTAG, J., von SONNTAG, C. The reaction of cytidine and 2'-deoxycytidine with $\text{SO}_4^{\cdot-}$ revisited. Pulse radiolysis and product studies. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 1, p. 401-408, 2003.
- BACELLAR, I. O. L.; PAVANI, C.; SALES, E. M.; ITRI, R.; WAINWRIGHT, M.; BAPTISTA, M. S. Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 90, p. 801-13, 2014.
- BALTAZAR, L. M.; RAY, A.; SANTOS, D. A.; CISALPINO, P. S.; FRIEDMAN, A. J.; NOSANCHUK, J. D. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-11, 2015.
- BALTAZAR, L. M.; SOARES, B. M.; CARNEIRO, H. C.; AVILA, T. V.; GOUVEIA, L. F.; SOUZA, D. G.; FERREIRA, M. V. L.; PINOTTI, M.; SANTOS, D. A.; CISALPINO, P. S. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: *in vitro* activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 354-361, 2013.
- BARROS, H. R. B.; SILVA, S. H.; MARQUES, E. R.; ROSA, J. C.; YATSUDA, A. P.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. L. A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. **Fungal Biology**, v. 114, p. 572-579, 2010.
- BELL, J. A.; MacGILLIVRAY, J. D. Photosensitized oxidation by singlet oxygen. **Journal of Chemical Education**, v. 51, n. 10, p. 677-679, 1974.
- BEN-DROR, S.; BRONSHTEIN, I.; WIEHE, A.; RÖDER, B.; SENGE, M. O.; EHRENBERG, B. On the correlation between hydrophobicity, liposome binding and cellular uptake of porphyrin sensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, p. 695-701, 2006.
- BERGAMINI, C. M.; GAMBETTI, S.; DONDI, A.; CERVELLATI, C.; Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 1611-1626, 2004.
- BERNNAN, M.; THOMAS, D. Y.; WHITEWAY, M.; KAVANAGH, K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonell* larvae. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 153-157, 2002.
- BILSKI, P.; MOTTEN, A. G.; BILSKA, M.; CHIGNELL, C. F. The photooxidation of diethylhydroxylamine by rose Bengal in micellar and nonmicellar aqueous solutions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 58, p. 11-18, 1993.
- BÖCKING, T.; BARROW, K. D.; NETTING, A. G.; CHILCOTT, T. C.; COSTER, H. G. L.; HÖFER, M. Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 1607-1618, 2000.

- BOUTATI, E. I.; ANAISSIE, E. J. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. **Blood**, v. 90, p. 999-1008, 1997.
- BRAGA, G. U. L.; DESTÉFANO, R. H. R.; MESSIAS, C. L. Oxygen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on different carbon sources. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, p. 112-119, 1999.
- BUSHELMAN, S. J.; CALLEN, J. P.; ROTH, D. M.; CHOHN, L. M. Disseminated *Fusarium solani* infection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, p. 346-351, 1995.
- CALZAVARA-PINTON, P.; ROSSI, M. T.; SALA, R.; VENTURINI, M. Photodynamic antifungal chemotherapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 512-522, 2012.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 279-293, 2005.
- CHABRIER-ROSELLÓ, Y.; FOSTER, T. H.; PÉREZ-NAZARIO, N.; MITRA, S.; HAIDARIS, C. G. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4288-4295, 2005.
- CHEN, S.; SCHOPFER, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions a novel function of peroxidase. **European Journal of Biochemistry**, v. 260, p. 726-735, 1999.
- CHIBEBE JUNIOR, J.; FUCHS, B. B.; SABINO, C. P.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C.; RIBEIRO, M. S.; GILMORE, M. S.; RICE, L. B.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R.; MYLONAKIS, E. Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2013b.
- CHIBEBE JUNIOR, J.; SABINO, C. P.; TAN, X.; JUNQUEIRA, J. C.; WANG, Y.; FUCHS, B. B.; JORGE, A. O. C.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R.; MYLONAKIS, E. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 217, p. 1-9, 2013a.
- CORDEIRO, R. M.; MIOTTO, R.; BAPTISTA, M. S. Photodynamic efficiency of cationic meso-porphyrins at lipid bilayers: insights from molecular dynamics simulations. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 116, p. 14618-14627, 2012.
- DAI, T.; FUCHS, B. B.; COLEMAN, J. J.; PRATES, R. A.; ASTRAKAS, C.; St. DENIS, T. G.; RIBEIRO, M. S.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M. R.; TEGOS, G. P. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-16, 2012.
- DAI, T.; FUCHS, B. B.; COLEMAN, J. J.; PRATES, R. A.; ASTRAKAS, C.; St. DENIS, T. G.; RIBEIRO, M. S.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M. R.; TEGOS, G. P. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-16, 2012.
- DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. The photoactivated cercospora toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 461-490, 2000.
- DAVEY, H. M.; HEXLEY, P. Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 163-171, 2011.
- DAVIES, K. J. A. Protein damage and degradation by oxygen radicals, I. general aspects. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 20, p. 9895-9901, 1987.
- DAVIES, M. J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, p. 761-770, 2003.
- De MENEZES, H. D.; PEREIRA, A. C.; BRANCINI, G. T. P.; LEÃO, H. C.; MASSOLA Jr., N. S.; BACHMANN, L.; WAINWRIGHT, M.; BASTOS, J. K.; BRAGA, G. U. L. Furocoumarins and coumarins

- photoinactivate *Colletotrichum acutatum* and *Aspergillus nidulans* fungi under solar radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 131, p.74-83, 2014a.
- De MENEZES, H. D.; RODRIGUES, G. B.; TEIXEIRA, S. P.; MASSOLA Jr., N. S.; BACHMANN, L.; WAINWRIGHT, M.; BRAGA, G. U. L. *In vitro* photodynamic inactivation of plant-pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with novel phenothiazinium photosensitizers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1623-1632, 2014b.
- De PAULA; L. F.; SANTOS, R. O.; MENEZES, H. D.; BRITTO, J. R.; VIEIRA Jr., J. B.; FILHO, P. P. G.; OLIVEIRA, C. A. A comparative study of irradiation systems for photoinactivation of microorganisms. **Journal of Brazilian chemical society**, v. 21, n. 4, p. 694-700, 2010
- DE SOUZA, S. C.; JUNQUEIRA, J. C.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C. Y.; MUNIN, E.; JORGE, A. O. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 83, p. 34-38, 2006.
- DEMINOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2329-2335, 2005.
- DEMINOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2329-2335, 2005.
- DESALERMOS A.; FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. 1-4, 2012.
- DESESSO, J. M.; SCIALLI, A. R.; GOERINGER, G. C. D-manitol, a specific hydroxyl free radical scavenger, reduces the developmental toxicity of hydroxyurea in rabbits. **Teratology**, v. 49, p. 248-259, 1994.
- DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3897-3916, 2004.
- DONNELLY, R. F.; McCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v. 163, p. 1-12, 2008.
- DONNELLY, R. F.; McCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v. 163, p. 1-12, 2008.
- DONNELLY, R. F.; McCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M.; WOOLFSON, A. D. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterization of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 87, p. 59-69, 2007.
- DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 58, p. 895-900, 1993.
- DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; RIBEIRO, A. P. D.; BRUNETTI, I. L.; COSTA, C. A. S.; JACOMASSI, D. P.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Investigation of the effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 895-903, 2011.
- FISCHER, F.; GRASCHEW, G.; SINN, H. J.; MAIER-BORST, W.; LORENZ, W. J.; SCHLANG, P. M. A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers. **Clinical Chimica Acta**, v. 274, n. 1, p. 89-104, 1998.
- FOOTE, C. S. Definition of type-I and type-II photosensitized oxidation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n.5, p. 659-659, 1991.
- FOOTE, C. S. Photosensitized oxygenation and the role of singlet oxygen. **Accounts of Chemical Research**, v. 1, p. 104-105, 1979.
- FUCHS, B. B.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R.; MYLONAKIS, E. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 2929-2936, 2007.

- GAMIS, A. S.; GUDNASON, T.; GIEBINK, G. S.; RAMSAY, N. K. Disseminated infection with *Fusarium* in recipients of bone marrow transplants. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, p. 1077-1088, 1991.
- GIULIANI, F.; MARTINELLI, M.; COCCHI, A.; ARBIA, D.; FANTETTI, L.; RONCUCCI, G. *In Vitro* Resistance Selection Studies of RLP068/Cl, a New Zn(II) Phthalocyanine Suitable for Antimicrobial Photodynamic Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 637-642, 2010.
- GOBO, N. R. S.; BROCKSOM, T. J.; ZUKERMAN-SCPECTOR, J.; OLIVEIRA, K. T. Synthesis of an Octa-*tert*-butylphthalocyanine: a low-aggregating and photochemically stable photosensitizer. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2013, p. 5028-5031, 2013.
- GODOY, P.; NUNES, F.; SILVA, V.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; ZAROR, L.; FISCHMAN, O. Onychomycosis caused by *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 157, p. 287-290, 2004.
- GONZALES, F. P.; DA SILVA, S. H.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. L. Photodynamic Inactivation of Conidia of the Fungi and with Methylene Blue and Toluidine Blue. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 637-642, 2010.
- GONZALES, F. P.; MAISCH, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infection. **Fungal Biology**, v. 116, p. 1-10, 2012.
- GORDON, T. R.; SWETT, C. L.; WINGFIELD, M. J. Management of *Fusarium* diseases affecting conifers. **Crop Protection**, v. 73, p. 28-39, 2015.
- GUARRO, J.; GENÉ, J. Opportunistic fusarial infections in humans. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14, p. 741-754, 1995.
- GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, p. 353-367, 2008.
- HALLIWELL, B. Manganese ions, oxidation reactions and the superoxide radical. **Neurotoxicology**, v. 5, p. 113-117, 1984.
- HALLIWELL, B. Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. **Medicine and Biology**, v. 62, p. 71-77, 1984.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of iron in oxygen radical reactions. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 47-56, 1984.
- HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemistry and Photobiology Science**, v. 3, p. 436-450, 2004.
- HAMBLIN, M. R.; O'DONNELL, A.; MURTHY, N.; CONTAG, C. H.; HASAN, T. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by *in vivo* bioluminescence imaging. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, p. 51-57, 2002.
- HARBOUR, J. R.; ISSLER, S. R. Involvement of the azide radical in the quenching of singlet oxygen by azide anion in water. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 3, p. 903-905, 1982.
- HEADLAM, H. A.; DAVIES, M. J. Beta-scission of side-chain alkoxyl radicals on peptides and proteins results in the loss of side chains as aldehydes and ketones. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, p. 1171-1184, 2002.
- HEADLAM, H. A.; DAVIES, M. J. Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 36, n. 9, p. 1175-1184, 2004.

- HEADLAM, H. A.; MORTIMER, A.; EASTON, C. J.; DAVIES, M. J. H-Scission of C-3 (h-carbon) alkoxyl radicals on peptides and proteins: a novel pathway which results in the formation of a-carbon radicals and the loss of amino acid side chains. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, p.1087–1095, 2000.
- HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does Photodynamic therapy work? **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, p. 145-157, 1992.
- HEWITT, C. J.; NEBE-VON-CARON, G. An Industrial application of multiparameter flow cytometry: Assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. **Cytometry**, v. 44, p. 179-187, 2001.
- HOWARD, J. A.; MENDENHALL, G. D. Autoxidation and photooxidation of 1,3-diphenylisobenzofuran - kinetic and product study. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 2199-2201, 1975.
- IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of tetrasulfonated silicon and germanium phthalocyanines in aqueous and non-aqueous media. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 197, p. 273-280, 2008.
- IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminium phthalocyanines in the presence of magnetic fluid. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 188, p. 200-206, 2007.
- INANO, S.; KIMURA, M.; IIDA, J.; ARIMA, N. Combination therapy of voriconazole and terbinafine for disseminated fusariosis: case report and literature review. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 19, p. 1173-1180, 2013.
- ISHIDA, K.; ALVIANO, D. S.; SILVA, B. G.; GUERRA, C. R.; COSTA, A. S.; NUCCI, M.; ALVIANO, C. S.; ROZENTAL, S. Negative correlation between phospholipase and esterase activity produced by *Fusarium* isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 5, p. 411-416, 2012.
- ITO, T. Cellular and subcellular mechanisms of photodynamic action: the $^1\text{O}_2$ hypothesis as a driving force in recent research. **Photochemistry and Photobiology**, v. 28, p. 493-508, 1978.
- ITO, T. Some differences between 470 nm and 510 nm in the acridine-orange-sensitized photodynamic actions on yeast cells. **Mutation Research**, v. 20, p. 201-206, 1973.
- ITO, T. Toluidine blue: The mode of photodynamic action in yeast cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 25, p. 47–53. 1977.
- JENA, N. R. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. **Journal of Biosciences**, v. 37, n. 3, p. 503-517, 2012.
- JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.25, p.505-520, 2006.
- JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. **Metal-Based Drug**, v. 2008, p. 1-24, 2008.
- JUNQUEIRA, J. C.; MARTINS J. da S.; FARIA, R. L.; COLOMBO, C. E.; JORGE, A. O. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. **Laser in medical science**, v. 24, p. 877-884, 2009.
- JUZENIENE, A.; MOAN, J. The history of PDT in Norway Part one: Identification of basic mechanisms of general PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.4, p. 3-11, 2007.
- KANE, P.M.; The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H^+ -ATPase. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70. p. 177-91, 2006.
- KASIMOVA, K. R.; SADASIVAM, M.; LANDI, G.; SARNA, T.; HAMBLIN, M. R. Potentiation of photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria mediated by six phenothiazinium dyes by addition of azide ion. **Photoschemical & Photobiological Sciences**, v. 13, p. 1541-1548, 2014.

- KIM, H.; KIM, K.W.; YUN, S. Multiple roles of a putative vacuolar protein sorting associated protein 74, FgVPS74, in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. **The Journal of Microbiology**, v. 53, p. 243-249, 2015.
- KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **Journal of Microbiology**, v. 49, p. 171-177, 2011.
- KLIONSKY, D.J.; HERMAN, P.K.; EMR, S.D. The fungal vacuole: Composition, function, and biogenesis. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 266-292, 1990.
- KOCHEVAR, I. E.; LAMBERT, C. R.; LYNCH, M. C.; TEDESCO, A. C. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 223-230, 1996.
- KOIKE, S. T.; GORDON, T. R. Management of *Fusarium* wilt of strawberry. **Crop Protection**, v. 73, p. 67-72, 2015.
- KRALJIC, I.; SHARPATYI, V. A. Determination of singlet oxygen rate constants in aqueous-solution. **Photochemistry and Photobiology**, v. 28, n. 4-5, p. 583-586, 1978.
- LAM, M.; JOU, P. C.; LATTIF, A. A.; LEE, Y.; MALBASA, C. L.; MUKHERJEE, P. K.; OLEINICK N. L.; GHANNOUM, M. A.; COOPER, K. D.; BARON, E. D. Photodynamic therapy with Pc 4 induces apoptosis of *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 904-909, 2011.
- LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C. G.; VAN MARLE, J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 2026-2034, 2005.
- LIU, F.; LU, W.; FANG, Y.; LIU, J. Evolution of oxidation dynamics of histidine: non-reactivity in the gas phase, peroxides in hydrated c-clusters, and pH dependence in solution. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, p. 22179-22191, 2014.
- LLEDÍAS, F.; RANGEL, P.; HANSBERG, W. Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1396-404, 1999.
- LUKE, T. L.; MOHAN, H.; MANOJ, V. M.; MANOJ, P.; MITTAL, J. P.; ARAVINDAKUMAR, C. T. Reaction of sulphate radicals anion ($\text{SO}_4^{\cdot-}$) with hydroxyl- and methyl-substituted pyrimidines: a pulse radiolysis study. **Research on Chemical Intermediates**, v. 29, n. 4, p. 379-391, 2003.
- MA, J.; JIANG, L. Photogeneration of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and free radicals ($\text{Sen}^{\cdot-}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$) by tetra-brominated hypocrellin B derivative. **Free Radical Research**, v. 35, p. 767-777, 2001.
- MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, p. 105-129, 2001.
- MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicações e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, p. 237-243, 2000.
- MARTINO, P.; GASTALDI, R.; RACCAH, R.; GIRMENIA, C. Clinical patterns of *Fusarium* infections in immunocompromised patients. **Journal of Infection**, v. 28, p. 7-15, 1994.
- McGOVERN, R. J. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. **Crop Protection**, v. 73, p. 78-92, 2015.
- MONEA, A.; MEZEI, T.; POPSOR, S.; MONEA, M. Oxidative stress: A link between diabetes mellitus and periodontal disease. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 1-5, 2014.

- MUNIN, E.; GIROLDO, L. M.; ALVES, L. P.; COSTA, M. S. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 88, n. 1, p. 16-20, 2007.
- NAGATA, S.; OBANA, A.; GOHTO, Y.; NAKAJIMA, S. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na). **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, p. 64-70, 2003.
- NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 479-504, 1994.
- NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 139, p. 271-279, 1991.
- NOODT, B. B.; RODAL, G. H.; WAINWRIGHT, M.; PENG, Q.; HOROBIN, R.; NESLAND, J. M.; BERG, K. Apoptosis induction by different pathways with methylene blue derivative and light from mitochondrial sites in V79 cells. **International Journal of Cancer**, v. 75, p. 941-948, 1998.
- NUCCI, M.; MARR, K. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; MARTINS, C. A.; TRABASSO, p.; COSTA, S.; VOLTARELLI, J. C.; COLOMBO, A. L.; IMHOF, A.; PASQUINI, R.; MAIOLINO, A.; SOUZA, C. A.; ANAISSIE, E. *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 1237-1242, 2004.
- NUNES, M. C. P.; BARBOSA, F. B. L.; GOMES, G. H. M.; BRÁULIO, R.; NICOLIELLO, M. F.; FERRARI, T. C. A. Fatal right-sided endocarditis caused by *Fusarium* in an immunocompromised patient: a case report. **Mycoses: Diagnosis, therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases**, v. 54, p. 460-462, 2010.
- NUNLEY, K. S.; CORNELIUS, L. Current management of onychomycosis. **The Journal of Hand Surgery**, v. 33A, p. 1211-1214, 2008.
- OH, Y. T.; AHN, C. S.; KIM, J. G.; RO, H. S.; LEE, C. W.; KIM, J. W. Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, p. 246-253, 2010.
- OLIVEIRA, A. S.; LICSANDRU, D.; BOSCEANU, R.; SOCOTEANU, R.; NACEA, V.; FERREIRA, L. F. V. A singlet oxygen photogeneration and luminescence study of unsymmetrically substituted mesoporphyrinic compounds. **International Journal of Photoenergy**, v. 2009, p. 10, 2009.
- OLIVEIRA, C. A.; MACHADO, A. E. H.; PESSINE, F. B. T. Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for use in photodynamic therapy. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 113, p. 69-78, 2005.
- ORIEL, S.; NITZAN, Y. Mechanistic aspects of photoinactivation of *Candida albicans* by exogenous porphyrins. **Photochemistry and photobiology**, v. 88, p. 604-612, 2012.
- PAARDEKOOOPER, M.; BROEK, P. V. D.; BRUIJNE, A. D.; ELFERINK, J.; DUBBELMAN, T.; STEVENINCK, J. V. Photodynamic treatment of yeast cells with the dye toluidine blue: all-or-none loss of plasma membrane barrier properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.11, n. 08, p. 86-90, 1992.
- PAARDEKOOOPER, M.; BRUIJNE, A. W. D.; STEVENINCK, J. V.; DEN BROEK, P. J. A. Inhibition of transport systems in yeast by photodynamic treatment with toluidine blue. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1151, p. 143-148, 1993.
- PASHKOVSKAYA, A. A.; SOKOLENKO, E. A.; SOKOLOV, V. S.; KOTOVA, E. A.; ANTONENKO, Y. N. Photodynamic activity and binding of sulfonated metalophtanolcyanines to phospholipid membranes: Contribution of metal-phosphate coordination. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 2498-2465, 2007.
- PAVANI, C.; UCHOA, A. F.; OLIVEIRA, C. S.; IAMAMOTO, Y.; BAPTISTA, M. S. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 8, p. 233-240, 2009.

- PEREIRO Jr. M.; PEREIRO FERREIRÓS, M. M.; DE HOOG, G. S.; TORIBIO, J. Cutaneous infection caused by *Alternaria* in patients receiving tacrolimus. **Medical Mycology**, v. 42, p. 277-282, 2004.
- PINCELLI, T. P. H.; BRANDT, H. R. C.; MACIEL, F. V. R.; CRIADO, P. R. Fusariose em pacientes imunocomprometido: sucesso terapêutico com voriconazol. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n.4, p. 331-334, 2008.
- PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic the fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, p. 259-268, 2009.
- PRATES, R. A.; KATO, I. T.; RIBEIRO, M. S.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 4, p. 1-8, 2011.
- RABODONIRINA, M.; PIENS, M. A.; MONIER, M. F.; GUÉHO, E.; FIÈRE, D.; MOJON, M. *Fusarium* infections in immunocompromised patients: care reports and literature review. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 13, p. 152-161, 1994.
- REKHA, A.; KINDO, A. J.; RAVI, A. *Fusarium solani* in the Post-transplant Patient: Na Unusual Fungus. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 7, p. 38-42, 2008.
- REQUENA, J.; CHAO, C-C.; LEVINE, R. L.; STADTMAN, E. R. Gkutamie and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. **Proceedings of the Nation Academy of Science of the United States of America**, v. 98, n. 1, p. 69-74, 2001.
- REVEES, E. P.; MESSINA, C. G.; DOYLE, S.; KAVANAGH, K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. **Mycopathology**, v. 158, n. 1, p. 9-79, 2004.
- RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1458-1461, 2006.
- RODRIGUES, G. B.; DIAS-BARUFFI, M.; HOLMAN, N.; WAINWRIGHT, M.; BRAGA, G. U. L. *In vitro* photodynamic inactivation of *Candida* species and mouse fibroblasts with phenothiazinium photosensitisers and red light. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, p. 141-149 2013.
- RODRIGUES, G. B.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C. BRAGA, G. U. L. *In vitro* photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans* melanized cells with chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 440-447, 2012.
- ROKITSKAYA, T. I. BLOCK, M.; ANTONENKO, Y. N.; KOTOVA, E. A.; POHL, P. Photosensitizer binding to lipid bilayers as a precondition for the photoinactivation of membrane channels. **Biophysical Journal**, v. 78, p. 2572-2580, 2000.
- ROSSETI, I. B.; CHAGAS, L. R.; COSTA, M. S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. **Lasers Medical Science**, v. 29, p. 1059-1064, 2014.
- SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A rewiew. **Biological Control**, v. 50, p. 205-221, 2009.
- SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. N.; van LIER, J. E. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. **Methods in Enzymology**, v. 319, p. 376-400, 2000.
- SHEN, H-R.; SPIKES, J. D.; SMITH, C. J.; KOPECEK, J. Photodynamic cross-linking of proteins, IV. Nature of the His-His bond(s) formed in the rose bengal-photosensitized cross-linking of N-benzoyl-L-histidine. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 130, p. 1-6, 2000.

- SMIJS, T. G. M.; PAVEL, S.; TALEBI, M.; BOUWSTRA, J. A. Preclinical studies with 5,10,15-tris(4-methylpyridinium)-20-phenyl-[21H, 23H]-porphine trichloride for the photodynamic treatment of superficial mycoses caused by *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 733-739, 2009.
- SMIJS, T. G. M.; PAVEL, S. The susceptibility of dermatophytes to photodynamic treatment with special focus on *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and Potobiology**, v. 87, p. 2-13, 2011.
- SMIJS, T. G.; BOUWSTRA, J. A.; TALEBI, M.; PAVEL, S. Investigation of conditions involved in the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 750-759, 2007.
- SMIJS, T. G.; MULDER, A. A.; PAVEL, S.; ONDERWATER, J. J.; KOERTEN, H. K.; BOUWSTRA, J. A. Morphological changes of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* after photodynamic treatment: a scanning electron microscopy study. **Medical Mycology**, v. 46, p. 315-325, 2008.
- SO, C. W.; TSANG, P. W.; LO, P. C.; SENEVIRATNE, C. J.; SAMARANAYAKE; L. P.; FONG, W. P. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* by BAM-SiPc. **Mycoses**, v. 53, n. 3, p. 215-220, 2010.
- SREERAM, M.; SURYAKAR, A. N.; DANI, N. H. Is gamma-glutamyl transpeptidase a biomarker for oxidative stress in periodontitis? **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 19, n. 2, p. 150-154, 2015.
- St. DENIS, T. G.; DAI, T.; IZIKSON, A.; ASTRAKAS, C.; ANDERSON, R. R.; HAMBLIN; M. R.; TEGOS, G. P. All you need is light: Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. **Virulence**, v. 2, p. 1-12, 2011.
- TIJSEN, J. P. F.; BEEKES, H. W.; VAN STEVENINCK, J. Localization of polyphosphates at the outside of the yeast cell plasma membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 649, p. 529-532. 1981.
- TOSTI, A.; PIRACCINI, B. M.; LORENZI, S.; IORIZZO, M. Treatment of nondermatophyte mold and *Candida* onychomycosis. **Dermatologic Clinics**, v. 21, p. 491-497, 2003.
- USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.29, p.165-173, 2001.
- USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33(5), p. 311-319, 2003.
- USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; USACHEV, Y. M.; SIEVERT, C. E.; BIEL, M. A. Interaction of the photobactericides methylene blue and toluidine blue with a fluorophore in *Pseudomonas aeruginosa* cells. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40(1), p. 55-61, 2008.
- VALENZENO, D. P. Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 46, p. 147-160, 1987.
- VERA, D. M. A.; HAYNES, M. H.; BALL, A. R.; DAI, T.; ASTRAKAS, C.; KELSO, M. J.; HAMBLIN, M. R.; TEGOS, G. P. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 499-511, 2012.
- VESES, V.; RICHARDS, A.; GOW, N.A. Vacuoles and fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 503-513, 2008.
- VOROBAY, A. V.; PINCHUK, S. V. Photodamage to spores of *Fusarium* fungi sensitized by protoporphyrin IX. **Biophysics**, v. 53, p. 386-389, 2008.
- WAINWRIGHT, M. In defence of “dye therapy”. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 1, p. 26-29, 2014.
- WAINWRIGHT, M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. **Chemical Society Reviews**, p. 351-359, 1996.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 13-28, 1998.

WAINWRIGHT, M. The development of phenothiazinium photosensitisers. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 263-272, 2005.

WAINWRIGHT, M., GIDDENS R. M. Phenothiazinium photosensitizers: choices in synthesis and application. **Dyes and Pigments**, v. 57, p. 245-257, 2003.

WAINWRIGHT, M.; McLEAN, A. Rational design of phenothiazinium derivatives and photoantimicrobial drug discovery. **Dyes and Pigments**, v. 135, p. 590-600, 2016.

WANG, P.; QIN, F.; WANG, L.; LI, F.; ZHENG, Y.; SONG, Y.; ZHANG, Z.; CAO, W. Luminescence and photosensitivity of gadolinium labeled hematoporphyrin monomethyl ether. **Optics Express**, v. 22, n. 3, p. 2414-2422, 2014.

WEIL, L.; GORDON, W. G.; BUCHERT, A. R. Photooxidation of amino acids in the presence of methylene blue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 33, p. 90-109, 1951.

WEISHAUP, K. R.; GOMER, C. J.; DOUGHERTY, T. J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. **Cancer Research**, v. 36, p. 2326-2329, 1976.

WICKERN, G. M. *Fusarium* allergic fungal sinusitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 92, p. 624-625, 1993.

WIEDERHOLD, N. P.; NAJVAR, L. K.; BOCANEGRA, R.; GRAYBILL, J. R.; PATTERSON, T. F. Efficacy of posaconazole as treatment and prophylaxis against *Fusarium solani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1055-1059, 2010.

WILKINSON, F.; HELMAN, W.P.; ROSS, A.B. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet-state of molecular-oxygen in solution - an expanded and revided compilatiopn. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 24, n. 2, p. 663-1021, 1995.

WILSON, M.; MIA, N. Sensitization of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **Journal of Oral Pathology**, v. 22, p. 354-357, 1993.

APÊNDICE A - Figura suplementar

Figura suplementar 1 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e germinados. Inativação fotodinâmica de *Fusarium oxysporum* com MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Os microconídios não germinados e germinados foram incubados com os FS por 30 min e lavados ou não lavados antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

APÊNDICE B - Figura suplementar

Figura suplementar 2 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e germinados. Inativação fotodinâmica de *Fusarium moniliforme* com MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Os microconídios não germinados e germinados foram incubados com os FS por 30 min e lavados ou não lavados antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

APÊNDICE C - Figura suplementar

Figura suplementar 3 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e germinados. Inativação fotodinâmica de *Fusarium solani* com MB (A), TBO (B), NMBN Zn (C) e S137 (D). Os microconídios não germinados e germinados foram incubados com os FS por 30 min e lavados ou não lavados antes da exposição à luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

APÊNDICE D - Figura suplementar

Figura suplementar 4 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e germinados. Inativação fotodinâmica de *Fusarium oxysporum* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 4 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de uma solução de manitol; (3) Adição de uma solução de azida de sódio e (4) Adição de uma solução de Glutathione, antes da exposição a luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

APÊNDICE E - Figura suplementar

Figura suplementar 5 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e germinados. Inativação fotodinâmica de *Fusarium moniliforme* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 4 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de uma solução de manitol; (3) Adição de uma solução de azida de sódio e (4) Adição de uma solução de Glutathione, antes da exposição a luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

APÊNDICE F - Figura suplementar

Figura suplementar 6 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e germinados. Inativação fotodinâmica de *Fusarium solani* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 4 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de uma solução de manitol; (3) Adição de uma solução de azida de sódio e (4) Adição de uma solução de Glutaciona, antes da exposição a luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

APÊNDICE G - Figura suplementar

APÊNDICE H - Figura suplementar

Figura suplementar 8 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e germinados. Inativação fotodinâmica de *Fusarium moniliforme* com MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 6 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de uma solução de cloreto de zinco; (3) Adição de uma solução de azida de sódio; (4) Adição de uma solução de cloreto de zinco e azida de sódio; (5) Adição de uma solução de EDTA e (6) Adição de uma solução de EDTA e azida de sódio, antes da exposição a luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

APÊNDICE I - Figura suplementar

Figura suplementar 9 – Efeito da IFA na sobrevivência de microconídios não germinados e germinados. Inativação fotodinâmica de *Fusarium solani* MB (A e B), TBO (C e D), NMBN Zn (E e F), NMBN (G e H) e S137 (I e J). Os microconídios não germinados e germinados foram incubados com os FS por 30 min e divididos em 6 tratamentos: (1) Não lavado; (2) Adição de uma solução de cloreto de zinco; (3) Adição de uma solução de azida de sódio; (4) Adição de uma solução de cloreto de zinco e azida de sódio; (5) Adição de uma solução de EDTA e (6) Adição de uma solução de EDTA e azida de sódio, antes da exposição a luz vermelha. Cada valor é a média de 3 experimentos independentes e a barra de erro indica o desvio padrão da média.

APÊNDICE J - Análise proteômica**Materiais e métodos****Análise proteômica da inativação fotodinâmica antimicrobiana em microconídios de *F. oxysporum*****Inativação fotodinâmica antimicrobiana**

Cinco mililitros da suspensão de microconídios (concentração final foi de 4×10^7 células mL⁻¹ em PBS, pH 7,4) e 5 mL da solução de FS (concentração final foi de 50 e 20 µM para MB e 5 e 2,5 µM para NMBN Zn) foram misturados em um tubo de 15 mL. Os tubos foram mantidos no escuro por 30 min. O conteúdo de cada tubo (10 mL) foi transferido para uma placa de Petri de 60 mm de diâmetro, que foi exposta à luz nas seguintes combinações: para 20 e 50 µM de MB e fluências de 10 e 15 J cm⁻², respectivamente; para 2,5 e 5 µM de NMBN e fluências de 5 e 15 J cm⁻², respectivamente. Controles contendo a mesma concentração de FS e microconídios, porém não expostos à luz, foram preparados paralelamente a cada amostra irradiada. Cada experimento constituiu vinte exposições sucessivas a cada fluência e FS. Após a irradiação, uma alíquota foi removida para ensaios de sobrevivência dos microconídios (descrito no item 1.8). As células de cada tratamento foram imediatamente coletadas por centrifugação ($3000 \times g$, 5 min), lavadas 3 vezes com 5 mL de PBS e depois foram transferidas para tubos de 2 mL, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -70 °C até a extração de proteínas.

Extração e quantificação de proteínas

A cada tubo de 2 mL, provenientes do item anterior, foram adicionados 500 µL de tampão de extração [ureia 7 M, tiourea 2 M e CHAPS 4% (todos GE-Healthcare)] e 500 µL de pérolas de vidro (425-600 µm, Sigma-Aldrich). Foram adicionados ainda 5 µL de inibidor de protease (GE-Healthcare). Os microconídios foram lisados por cinco ciclos de um minuto de agitação em vortex seguido de cinco minutos de incubação em gelo. Os tubos foram centrifugados a $10000 \times g$ por cinco minutos a 4 °C e o sobrenadante resultante foi coletado. As proteínas, contidas no sobrenadante, foram purificadas pela adição de seis volumes de acetona (grau HPLC, Sigma-Aldrich) e incubação "overnight" a -20 °C. Após remoção da acetona por centrifugação ($10000 \times g$ por cinco minutos a 4 °C), o precipitado proteico foi ressuspenso no mesmo tampão de extração e quantificado usando-se o 2-D Quant Kit (GE-Healthcare).

Eletroforese bidimensional (2-D)

A concentração de proteína foi ajustada para 20 µg em 250 µL de tampão de rehidratação [ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, ditiotretol (DTT) 40 mM, IPG buffer 3-

11 NL, 0,5%, inibidor de protease (GE-Healthcare) e azul de bromofenol 0,002% (m/v) (Sigma)]. Esse volume foi então aplicado a *strips* de 13 cm com faixa de pH 3-11 NL (Immobiline™ DryStrips, GE-Healthcare) e incubado por 16 h na temperatura ambiente. Após esse período, a focalização isoeletrica foi realizada em sistema IPGphor 3 (GE-Healthcare) seguindo o seguinte protocolo: 500 V (Step and Hold) até 0,5 kVh, 1000 V (Gradient) até 0,8 kVh, 8000 V (Gradient) até 11,3 kVh e 8000 V (Step and Hold) até que um total de 25 kVh fosse atingido. As *strips* foram equilibradas por 15 minutos em solução contendo Tris-HCl pH 8,8 75 mM (Sigma), ureia 6 M (GE-Healthcare), glicerol 30% (Synth, Brasil), dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% (Sigma) e DTT 1% (Sigma). O mesmo procedimento foi repetido, porém substituindo-se DTT 1 % por iodoacetamina 2,5% (m/v) (Sigma). O SDS-PAGE foi realizado em sistema SE 600 Ruby (GE-Healthcare) de acordo com protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Os géis foram corados com nitrato de prata segundo o protocolo "Short silver nitrate staining" previamente descrito (Chevallet; Luche; Rabilloud, 2006). As imagens dos géis foram obtidas com auxílio de um aparelho ImageScanner III e do programa Labscan (GE-Healthcare) e as análises de imagens foram feitas no ImageMaster 2D platinum & (GE-Healthcare).

Resultados

Análise do gel 2D de proteínas de microconídios expostos a IFA

As alterações causadas pela IFA com MB e NMBN nas proteínas de microconídios de *F. oxysporum* foram estudadas. Por intermédio do fracionamento do proteoma por gel bi-dimensional (2D) foi observado que a IFA com a menor fluência (10 J cm^{-2}) e concentração do MB (20 μM) induziu modificações visíveis no proteoma de *F. oxysporum* (**Figura 1 B e D**). Quando a fluência de luz e a concentração do MB foram aumentadas para 15 J cm^{-2} e 50 μM , respectivamente, as modificações no proteoma intensificaram-se (**Figura 1 A e C**), e também foi possível observar que o aumento da concentração do FS de 20 para 50 μM , dificultou a focalização isoeletrica em pH ácido (3 a 5) das proteínas presentes no controle (**Figura 1 A**). Alguns *spots* estão preservados na IFA com a menor fluência. Para o FS NMBN a IFA com a menor fluência (5 J cm^{-2}) e concentração 2,5 μM , induziu modificações visíveis no proteoma de *F. oxysporum* (**Figura 2 B e D**). O aumento da fluência de luz e a concentração de NMBN para 15 J cm^{-2} e 5 μM , respectivamente, intensificou as alterações no padrão da separação das proteínas (**Figura 2 A e C**). Também foi possível observar que alguns *spots* não sofreram modificações com a menor fluência. Os resultados iniciais sugerem que as modificações no proteoma causados pela IFA já podem ser observadas em tratamentos mais brandos (**Figura 1 B e D; Figura 2 B e D**). Será necessário efetuar réplicas biológicas

adicionais para verificar a reprodutibilidade dos resultados e viabilizar uma melhor análise das imagens. Bem como gel 2D das proteínas dos microconídios de *F. oxysporum* sem tratamento para obter imagem do padrão de corrida das proteínas do microrganismo.

Figura 1 – Gel 2-D (SDS-PAGE 12,5% corado pelo método da prata) das proteínas de microconídios de *F. oxysporum* após exposição a 50 μM de MB (A), 20 μM de MB (B) e após a IFA com as fluências 15 J cm^{-2} e 50 μM de MB (C) e 10 J cm^{-2} e 20 μM de MB (D).

Figura X – Gel 2-D (SDS-PAGE 12,5% corado pelo método da prata) das proteínas de microconídios de *F. oxysporum* após exposição a 5 μM de NMBN Zn (A), 2,5 μM de NMBN Zn (B) e após a IFA com as fluências 15 J cm^{-2} e 5 μM de NMBN Zn (C) e 5 J cm^{-2} e 2,5 μM de NMBN Zn (D).

ANEXO 1 – Artigo publicado em Setembro 2016.

De MENEZES H. D.; TONANI L.; BACHMANN L.; WAINWRIGHT M.; BRAGA G. U. L.; von ZESKA KRESS M. R. Photodynamic treatment with phenothiazinium photosensitizers kills both ungerminated and germinated microconidia of the pathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani*. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 164, p. 1-12, 2016. - doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.09.008.

Photodynamic treatment with phenothiazinium photosensitizers kills both ungerminated and germinated microconidia of the pathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium solani*

Henrique Dantas de Menezes^a, Ludmilla Tonani^a, Luciano Bachmann^b, Mark Wainwright^c, Gilberto Úbida Leite Braga^a, Marcia Regina von Zeska Kress^{a,*}

^a Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil

^b Departamento de Física, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil

^c School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, Liverpool John Moores University, Liverpool L3 3AF, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 September 2015

Received in revised form 5 September 2016

Accepted 6 September 2016

Available online xxxx

Keywords:

Antimicrobial photodynamic inactivation

Methylene blue derivatives

Photoantimicrobial

Fusarium oxysporum

Fusarium moniliforme

Fusarium solani

ABSTRACT

The search for alternatives to control microorganisms is necessary both in clinical and agricultural areas. Antimicrobial photodynamic treatment (APDT) is a promising light-based approach that can be used to control both human and plant pathogenic fungi. In the present study, we evaluated the effects of photodynamic treatment with red light and four phenothiazinium photosensitizers (PS): methylene blue (MB), toluidine blue O (TBO), new methylene blue N (NMBN) and the phenothiazinium derivative S137 on ungerminated and germinated microconidia of *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, and *F. solani*. APDT with each PS killed efficiently both the quiescent ungerminated microconidia and metabolically active germinated microconidia of the three *Fusarium* species. Washing away the unbound PS from the microconidia (both ungerminated and germinated) before red light exposure reduced but did not prevent the effect of APDT. Subcellular localization of PS in ungerminated and germinated microconidia and the effects of photodynamic treatment on cell membranes were also evaluated in the three *Fusarium* species. APDT with MB, TBO, NMBN or S137 increased the membrane permeability in microconidia and APDT with NMBN or S137 increased the lipids peroxidation in microconidia of the three *Fusarium* species. These findings expand the understanding of photodynamic inactivation of filamentous fungi with phenothiazinium PS.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Fusarium is a large genus of filamentous fungi widely distributed and easily found in soil. *Fusarium* species are important pathogens of plants, animals and humans [1–3]. Crop diseases caused by *Fusarium* spp. generate great economic losses in world production of fruits, vegetables, cereals, and cellulose [4–6]. Another important characteristic of the species of this genus is their ability to produce mycotoxins that contaminate many agricultural commodities affecting both human and animal health [7,8]. Currently, *Fusarium oxysporum* and *F. solani* are important emerging opportunistic pathogens that cause keratitis, onychomycoses and invasive fungal infection both in immunocompromised and immunocompetent patients [4,9,10].

During their asexual life cycle, *Fusarium* species produce a great number of microconidia [1]. These are quiescent structures produced

by several fungal species for dispersion and environmental persistence. Conidia are dispersed by wind or rain and when deposited on the host plants they germinate and initiate the infectious cycle [1,11,12]. Germination is generally triggered by nutrient sensing and is characterized by conidial swelling, adhesion, nuclear reorganization, and formation of a germ tube that is often used to define the limit between conidial germination and vegetative growth [13,14]. In addition to the marked difference in metabolic activity, ungerminated conidia differ from germlings in their biochemical composition, redox status, cell organization and structure and composition of the cell wall [15–19]. As conidium and germling are essential developmental phases in the fungal life cycle and critical for plant colonization, most conventional fungicides have been developed to target the conidial germination and early developmental stages [19].

The use of resistant plant varieties is the main and most effective choice [5] in the control of the colonization by *Fusarium* spp. However, these plants level of tolerance depends on the environmental conditions under which they grow [20]. Colonization by *Fusarium* spp. may be more severe in regions where temperatures are elevated, even when resistant plant varieties are used [20]. The control of *Fusarium* spp. also

* Corresponding author.

E-mail address: kress@fcfrp.usp.br (M.R. von Zeska Kress).

includes the use of seeds and seedlings treated with fungicides prior to planting, as well as the intensive use of fungicides during the development of the crop [5,20,21]. Unfortunately, failure in fungal control is common because of the selection of tolerant fungal strains. Furthermore, the intensive use of the currently available fungicides is a potential risk for humans and to the environment [21–23]. The control of fungal inoculum in the post-harvest (fruits and vegetables) is frequently carried out with chlorine and acids, even though these chemical sanitizers can be harmful to the environment [24,25].

The increased tolerance to currently used fungicides has stimulated the development of novel and more effective technologies to control pathogenic fungi. A promising alternative is the antimicrobial photodynamic treatment (APDT) which can be used to kill fungi both in animal hosts and in the environment [25–27]. APDT is based on the combination of three elements: photosensitizer (PS), light, and molecular oxygen. Usually, the chosen PS accumulates preferentially in the target cell or has affinity for the microbial cell surface; the light should be at the appropriate wavelength to activate the photochemical process, which, in the presence of molecular oxygen, produces several reactive oxygen species (ROS), such as singlet oxygen [26,28,29]. ROS can cause oxidative damage to practically all biomolecules (proteins, lipids, nucleic acids and carbohydrates) leading to the death of the fungal cell without causing significant damage to the host cell [26,30,31]. The multi-targeting feature of ROS reduces the chance of selecting resistant microorganisms. Another advantage of APDT is its ability to kill both metabolically active and quiescent structures such as ungerminated microconidia, in contrast to currently used fungicides that kill only metabolically active cells [30,32,33].

The efficacy of the photodynamic treatment with phenothiazinium PS to kill fungi has been described in different fungal genus such as *Candida*, *Trichophyton*, *Aspergillus* and *Metarhizium* [30,32,33]. We have recently demonstrated that phenothiazinium PS can easily kill conidia of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* without causing damage to the plant host [31]. We also demonstrated that phototreatment with natural PS such as coumarins and furanocoumarins can kill conidia of *C. acutatum* [27]. However, data concerning the APDT of plant-pathogenic fungi with synthetic PS are still scarce. Natural compounds (thiophene derivatives and phenylheptatriyne from the plant *Bidens pilosa*) have been used as PS to photoinactivate conidia of different genus including *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pythium* and *Saprolegnia* [34,35]. The hematoporphyrin dimethyl ether was used to photoinactivate conidia of *Aspergillus flavus*, *Fusarium avenaceum*, *Trichothecium roseum*, and *Rhizopus oryzae* [36].

Most of the studies that evaluated the effects of APDT on fungi were conducted with conidia. Little is known about the effects of APDT on other important fungal structures and developmental phases, such as germings. Thus, the aim of this study was to evaluate the efficacies of APDT with methylene blue (MB), toluidine blue O (TBO), new methylene blue N (NMBN), and the phenothiazinium derivative S137, both on ungerminated and germinated microconidia of the fungi *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, and *F. solani*. In order to better understand the mechanisms involved in microconidia photodynamic inactivation, we evaluated the effect of APDT with the phenothiaziniums PS on microconidial cell membranes by investigating lipid peroxidation and changes in membrane permeability. The localization of the PS inside the ungerminated and germinated microconidia was also determined.

2. Materials and Methods

2.1. *Fusarium* Species and Strains

Fusarium oxysporum INCQS 40144 (ATCC 48112), *F. moniliforme* INCQS 40151 (ATCC 38159), and *F. solani* INCQS 40099 (ATCC 36031) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA).

2.2. Photosensitizers and Visible Light Sources

Methylene blue (MB) (Catalog number M9140), toluidine blue O (TBO) (Catalog number 202096) and new methylene blue N zinc chloride double salt (NMBN) (Catalog number T3260) were purchased from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). The pentacyclic phenothiazinium PS S137 was synthesized as previously described [37]. All stock solution and all dilutions were prepared with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. The stock solutions were stored in the dark at -20°C up to 6 months and the dilutions of each PS were prepared at the experiment time. Chemical structures of all the PS are shown in Fig. S1 in the supplemental material.

Light was provided by an array of 96 light-emitting diodes (LED) with emission peak at 635 nm. The array was made in house using the Cree® 5-mm Round LED (Model number LC503UHR1 – 15Q-Q, CREE Inc., Durham, NC, USA). Light measurement was performed by using a cosine-corrected irradiance probe (CC-3-UV, Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) screwed onto the end of an optical fiber coupled to an USB spectroradiometer (Ocean Optics). Light was measured at the sample level (inside the well) to reduce interference. The integrated irradiance (570 to 670 nm) was 9.8 mW cm^{-2} .

2.3. Fungal Growth and Microconidia Production

Fungal cultures were grown on potato dextrose agar medium (PDA) (Acumedia Manufactures, Inc., Lansing, MI, USA) at 28°C for 5 days. After growth, 10-mL of sterile PBS, pH 7.4, were added to the surface of the culture, microconidia were gently scraped with a glass rod and the resulting suspension filtered through a sterile glass wool (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, SP, Brazil) to remove residual hyphae. Microconidia concentration was determined with a hemocytometer and appropriate dilutions were made with PBS, pH 7.4.

2.4. Evaluation of Metabolic Activities of Ungerminated and Germinated Microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani* by FUN-1 Staining and Flow Cytometry

The metabolic activity of the fungal cell can be measured by the conversion of the fluorescent probe FUN-1 [2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide] (green-fluorescent form) to the cylindrical intra-vacuolar structures (CVIS, red-fluorescent form) during endogenous biochemical processing, such as ATP production. Two hundred μL of *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, and *F. solani* microconidia suspension (8×10^6 cells mL^{-1}), and 200 μL of the RPMI 1640 culture medium (twofold concentrate) were added to a 1.5-mL tube. Tubes were incubated at 28°C for 4 h under shaking (150 rpm). After that, tubes were centrifuged 3 times at 5000g for 5 min to remove the RPMI 1640 culture medium. The germinated microconidia were resuspended in 400 μL of 10 mM sodium HEPES (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA), pH 7.2, supplemented with 2% D-(+)-glucose (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) and 10 μM FUN-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Tubes were held in the dark for 30 min at 28°C and the cells were analyzed by flow cytometry (FACSCanto – Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). Both the forward angle light scatter (FSC-H) and the side scatter (SSC-A) signal were used for gating, and a logarithmic amplifier was used. Ten thousand events were analyzed by FACSDiva software (BD, San Jose, CA, USA). Three independent experiments were performed. The conversion of FUN-1 to CVIS by the red ($585 \pm 40\text{ nm}$)/green ($530 \pm 30\text{ nm}$) fluorescence ratio was also evaluated on ungerminated microconidia, and on ungerminated microconidia exposed to the temperature of 95°C for 1 h (death control). Two independent experiments were performed.

2.5. Evaluation of APDT Effect on Ungerminated Microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani* Based on PS Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Values

The determination of optimal condition for the APDT with the phenothiazinium PS MB, TBO, NMBN and S137 was performed as previously described [31,33]. MIC-based experiments were performed in 96-well flat-bottomed microtiter plates (TPP, Switzerland). Fifty μL of the microconidia suspension (4×10^5 cells mL^{-1}) and 50 μL of the PS solution were added to the each well. The final concentrations of MB, TBO and NMBN were 0, 1, 2.5, 5, 10, 12.5, 25, 50, 75, 100 and 200 μM and the final concentrations of S137 were, 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 12.5, 20, 25, 30 and 40 μM . Plates were held in the dark for 30 min at 28 °C and exposed to light fluences of 10, 15 and 20 J cm^{-2} using the LED array as a light source, or alternatively kept in the dark (dark controls). After exposure, 100 μL of RPMI 1640 culture medium (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) (twofold concentrate) were added to each well, and plates were incubated at 28 °C. Growth was evaluated daily by visual inspection up to 4 days when the MIC were determined. The MIC was considered the minimal PS concentration for each fluence (10, 15 or 20 J cm^{-2}) in which total growth inhibition was achieved. Three independent experiments were performed.

2.6. Effects of APDT with MB, TBO, NMBN and S137 on the Survival of Ungerminated and Germinated Microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani*

The survival of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani* ungerminated and germinated microconidia was evaluated after APDT with MB, TBO, NMBN and S137. In order to obtain germinated microconidia, 5 mL of microconidia suspension (8×10^6 cells mL^{-1}) and 5 mL of the RPMI 1640 culture medium (twofold concentrate) were added to a 15-mL tube (Corning Incorporated, NY, USA). Tubes were incubated during 4 h at 28 °C under shaking at 150 rpm. After that, tubes were centrifuged at 4000g for 5 min and germlings were resuspended in 5 mL of PBS, pH 7.4. This process was repeated 3 times to remove the RPMI 1640 culture medium. Three hundred μL of ungerminated and germinated microconidia suspension, and 300 μL of the PS solution (MB, TBO, NMBN and S137) were added to a 1.5-mL tube (polypropylene; Axygen Scientific, CA, USA). The final cell concentration in the mixtures was 4×10^6 cells mL^{-1} and the final concentrations of MB, TBO, NMBN and S137 were 50, 75, 5, and 10 μM , respectively, for *F. oxysporum*; 75, 75, 10 and 10 μM for *F. moniliforme* and 75, 75, 12.5 and 10 μM for *F. solani*. Tubes were held in the dark for 30 min at 28 °C, and, after that, they were divided into 2 groups. In one group, ungerminated and germinated microconidia were washed to remove unbound PS, and in the

other group cells were not washed before light exposure. To remove unbound PS, cells were centrifuged at 5000g for five min and resuspended in PBS, pH 7.4. This process was repeated 3 times. Non-washed and washed ungerminated and germinated microconidia were placed into a 24-well flat-bottomed microtitre plate (TPP, Switzerland) and exposed to the fluences of 0 (dark control), 10 and 15 J cm^{-2} . After exposures, suspensions were removed and serially diluted 10-fold in PBS to give dilutions of 10^{-1} to 10^{-3} times the original concentration, and 50 μL of each dilution were spread on the surface of 5 mL PDA medium containing 0.08 g L^{-1} of deoxycholic acid sodium salt (Fluka, Italy) in Petri dishes (60 $\times$ 15 mm). Three replicates dishes were prepared for each treatment, and the dishes were incubated at 28 °C in the dark. Colony forming units (CFU) were counted daily at $8\times$ magnification up to seven days. The effects of the different treatments on ungerminated and germinated microconidia survival were determined based on CFU counting, as previously described [31,33]. Survival fractions were expressed as ratio of CFU of fungal cells treated only with light (light effect), only with PS (dark toxicity), and light and PS (APDT effect) to CFU treated with neither. Three independent experiments were performed.

2.7. Microscopy Studies of Ungerminated and Germinated Microconidia

Microscopic studies were performed to determine the subcellular localization of the PS in both ungerminated and germinated microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, and *F. solani*. To produce germlings, microconidia (4×10^6 cells mL^{-1}) were incubated in RPMI 1640 culture medium at 28 °C for 4 h. Both the ungerminated and germinated microconidia were treated with 100 μM of MB, TBO, NMBN, and S137 and washed three times with PBS (5000 g for 5 min) before being observed at 1000 $\times$ magnification (Coleman N-120 microscope, Coleman, Santo André, SP, Brazil). In an attempt to identify the cellular structures in which the PS accumulated, ungerminated microconidia and germlings were also stained with the fluorescent dyes 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) (3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in distilled water) and FM4-64 (Invitrogen™) [1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in 1% (vol/vol) dimethyl sulfoxide (DMSO) solution], which have affinity for genetic material, and cellular membranes, respectively. Ungerminated and germinated microconidia were treated with each of the 2 dyes, kept in the dark for 1 h, and washed three times with PBS before being observed with a Leica TCS SP8 Confocal laser microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) at 630 $\times$ magnification and digital zoom (2 $\times$). The samples were illuminated at 405 nm (DAPI) and 552 nm (FM4-64) and the signals were captured in two channels, one for acquisition of the DAPI fluorescence (410–540 nm), and the other for the acquisition of the FM4-64 fluorescence (570–700 nm). Transmitted light images were also obtained.

Microconidia metabolic activity

Fig. 1. Evaluation of the metabolic activity of ungerminated and germinated microconidia of *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, and *F. solani* by using the vital FUN-1 staining. Error bars are standard deviation of two independent experiments.

Table 1

Minimal inhibitory concentration (MIC – μM) of APDT with phenothiazinium PS MB, TBO, NMBN and S137 to *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, and *F. solani*. Results are MIC ranges from three independent experiments.

	PS/fluence	0	10 J cm^{-2}	15 J cm^{-2}	20 J cm^{-2}
<i>F. oxysporum</i>	MB	>200 μM	50–75 μM	50 μM	12.5–25 μM
	TBO	>200 μM	75 μM	75 μM	25–50 μM
	NMBN	>200 μM	5–12.5 μM	5–10 μM	2.5 μM
	S137	25–30 μM	12.5 μM	10 μM	5 μM
<i>F. moniliforme</i>	MB	>200 μM	75–150 μM	75–100 μM	25 μM
	TBO	>200 μM	75–100 μM	75 μM	10–12.5 μM
	NMBN	>200 μM	5–10 μM	10 μM	10 μM
	S137	25–30 μM	10 μM	10 μM	5 μM
<i>F. solani</i>	MB	>200 μM	75–100 μM	75 μM	25–75 μM
	TBO	>200 μM	75 μM	75 μM	12.5–25 μM
	NMBN	>200 μM	5–25 μM	5–12.5 μM	2.5–5 μM
	S137	12.5–25 μM	5–10 μM	5–10 μM	5 μM

Fig. 2. Effect of APDT on the survival of ungerminated microconidia. Photodynamic inactivation of *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, and *F. solani* with MB (A), TBO (B), NMBN (C), and S137 (D). Ungerminated microconidia were incubated with the PS for 30 min and washed or non-washed before red light exposure. Error bars are standard deviation of three independent experiments.

2.8. Evaluation of APDT Effect on Cell Membrane Permeability

Cell membrane permeability after APDT was assessed by flow cytometry analyses of propidium iodide (PI) staining microconidia. PI only penetrates cells with severe membrane damage. Three hundred μL of the microconidia suspension and 300 μL of the PS solution (MB, TBO, NMBN and S137) were added into a 24-well flat-bottomed microtitre plate (TPP, Switzerland). The final concentration of microconidia were 4×10^6 cells mL^{-1} and of MB, TBO, NMBN and S137 were 50, 75, 5, and 10 μM , respectively, for *F. oxysporum*; 75, 75, 10 and 10 μM for *F. moniliforme*, and 75, 75, 12.5 and 10 μM for *F. solani*. Plates were kept in the dark for 30 min at 28 °C and exposed to fluences of 0 (dark control) and 15 J cm^{-2} . Microconidia not treated with PS neither exposed to light were used as control of cell viability, and microconidia exposed to 95 °C for 1 h were used as “death control”. After APDT, microconidia were recovered from the wells to a 1.5-mL tube, washed once with PBS and 1 μL of PI solution (1 g L^{-1}) was added immediately before data acquisition by flow cytometry (FACSCanto — Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). Both the forward angle light scatter (FSC-H) and the side scatter (SSC-A) signal were used for gating, and a logarithmic amplifier was used. Ten thousand events were analyzed by FACSDiva software (BD, San Jose, CA, USA). We measured the percentage of cells stained with PI at each APDT condition. Three independent experiments were performed.

2.9. Lipid Peroxidation Assay

Polyunsaturated lipids are easily oxidized by reactive oxygen species resulting in a chain of reactions that has malondialdehyde (MDA) as a

major product. Lipid peroxidation after APDT was evaluated with the Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Sigma-Aldrich), according to the manufacturers' protocol, with modifications. After the photodynamic treatment was performed as described above, microconidia were recovered from the wells to a 1.5-mL tube, centrifuged at 5000g for 5 min. Microconidia were resuspended in 300 μL of MDA lysis buffer, containing 3 μL of BHT (Catalog number MAK085C Sigma-Aldrich) ($100\times$ concentrate), and homogenized on ice. Samples were centrifuged at 13,000g for 10 min to remove insoluble material and the supernatant from each samples was placed into a new 1.5-mL tube with the addition of 600 μL of thiobarbituric acid solution [0.250 g thiobarbituric acid reconstituted with 7.5 mL glacial acetic acid (J.T. Baker® Chemicals, Center Valley, USA), and the final volume was adjusted to 25 mL with water] and incubation at 95 °C for 1 h. After, the samples were cooled in an ice bath for 10 min and 200 μL from each sample were added into a 96-well flat-bottomed microtitre plate for analysis. The absorbance was measured at 532 nm with a Spectramax® Paradigm® Multi-Mode Detection Platform (Molecular Device LLC, Sunnyvale, CA, USA). The concentration of MDA was calculated based in the standard curve.

2.10. Statistical Analysis

Data were submitted to one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's post-test to compare the effects of the different treatments. No data transformations were required in any experiment. *P* values of <0.05 were considered significant. All computations were done using Graph pad Prism Software (v 5.0; Graph pad Software, La Jolla, CA, USA).

Fig. 3. Effect of APDT on the survival of germinated microconidia. Photodynamic inactivation of *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, and *F. solani* with MB (A), TBO (B), NMBN (C), and S137 (D). Germinated microconidia were incubated with the PS for 30 min and washed or non-washed before red light exposure. Error bars are standard deviation of three independent experiments.

3. Results

3.1. Evaluation of the Metabolic Activities of Ungerminated and Germinated Microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani* by FUN-1 Staining and Flow Cytometry

The conversion of FUN-1 stain from a green-fluorescent to a red-fluorescent form (cylindrical intravacuolar structures — CIVS) occurs via endogenous biochemical processes for ATP production. We evaluated the conversion of FUN-1 to CIVS, in ungerminated and germinated microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani*. Dead microconidia were used as control. The red/green fluorescence ratio in the death control was lower than in ungerminated and germinated microconidia. The red/green fluorescence ratios in *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani* germinated microconidia were approximately 2 times higher than the red/green ratios in ungerminated microconidia ($P < 0.05$ for all comparison) (Fig. 1).

3.2. Evaluation of APDT Effect on *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani* Ungerminated Microconidia Based on PS Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

The efficacy of APDT with each PS (MB, TBO, NMBN, and S137) combined with different fluences of red light (0, 10, 15, 20 J cm⁻²) was initially evaluated by determining the MIC values. The treatments with the highest concentration tested (200 μ M) of MB, TBO and NMBN in the absence of light did not inhibit the growth of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani* (Table 1). Only the PS S137 presented dark toxicity wherein the MIC ranges in the dark were 25–30 μ M for *F. oxysporum*, and *F. moniliforme*, and 12.5–25 μ M for *F. solani* (Table 1). Exposure of

microconidia to red light (at all fluences) in the absence of the PS did not inhibit the growth of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani* (data not shown). APDT with each of the PS at all fluences inhibited the growth of all species. The MIC for all PS and fluences are shown in Table 1. Although the MIC values varied among both the PS and species, the MIC values decreased with increasing fluence. NMBN and S137 were the most effective PS for all the species at all fluences. APDT with NMBN (15 J cm⁻²) inhibited the growth of *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, and *F. solani* at 5, 10 and 12.5 μ M, respectively. APDT with S137 (15 J cm⁻²) inhibited the growth of *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, and *F. solani* at 10 μ M.

3.3. Effects of APDT with MB, TBO, NMBN and S137 on Survival of Ungerminated and Germinated Microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani*

The effects of APDT on the survival of ungerminated and germinated microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani* are shown in Figs. 2 and 3. Exposures only to red light (light effect) and treatment only with MB, TBO, NMBN, and S137 (dark toxicity) did not kill microconidia of any species ($P > 0.05$ for all species) (Figs. 2 and 3). Photodynamic killing of ungerminated microconidia (Fig. 2) and germinated microconidia (Fig. 3) was observed for all PS at all fluences ($P < 0.05$ for all treatment comparisons). APDT with MB and fluences of 10 and 15 J cm⁻² resulted in an approximately 4 and 5-log reduction in the survival of ungerminated microconidia of *F. oxysporum* (MB 50 μ M); 1 and 3-log of *F. moniliforme* (MB 75 μ M) and 3.5 and 5-log of *F. solani* (MB 75 μ M) (Fig. 2A). APDT with TBO (75 μ M) and fluences of 10 and 15 J cm⁻² resulted in an approximately 4 and 5-log reduction of *F. oxysporum*; 1 and 2-log reduction of *F. moniliforme*, and 1.5 and 3-log

Fig. 4. *Fusarium oxysporum* ungerminated and germinated microconidia non-stained (A and I), stained with DAPI (B and J), stained with FM4-64 (C and K), and merged image (D and L) using the Leica Application Suite X software. Ungerminated and germinated microconidia were also treated with MB 100 μM (E and M), NMBN 100 μM (F and N), TBO 100 μM (G and O), and S137 100 μM (H and P). Arrows indicate the large vesicles formed in the cytoplasm of the germinated microconidia after treatment with S137 (P).

reduction of *F. solani* (Fig. 2B). APDT with NMBN (5, 10, and 12.5 μM) and fluences of 10 and 15 J cm^{-2} resulted in an approximately 5-log reduction in the survival of microconidia of all species (Fig. 2C). APDT with S137 (10 μM) and fluences of 10 and 15 J cm^{-2} resulted in an approximately 3 and 5-log reduction of *F. oxysporum*, 1 and 3-log reduction of *F. moniliforme*, and 5-log reduction of *F. solani* (Fig. 2D). Washing of the microconidia to remove unbound PS before light exposure reduced the effect of APDT at the fluence of 10 J cm^{-2} for MB (*F. oxysporum* and *F. solani*), NMBN (*F. oxysporum*, *F. moniliforme*, and *F. solani*), and S137 (*F. solani*). At the increased fluence of 15 J cm^{-2} washing reduced the effect of APDT for MB (*F. oxysporum* and *F. solani*), TBO (*F. oxysporum*), and NMBN (*F. moniliforme*) ($P < 0.05$ for all treatments) (Fig. 2).

The effects of APDT on germinated microconidia of *Fusarium* species are presented in Fig. 3. APDT with MB and fluences of 10 and 15 J cm^{-2} resulted in an approximately 5-log reduction in the survival of germings of *F. oxysporum* (MB 50 μM); 3 and 4-log reduction of *F. moniliforme* (MB 75 μM); and 4 and 5-log reduction of *F. solani* (MB 75 μM) (Fig. 3A). APDT with TBO (75 μM) and fluences of 10 and 15 J cm^{-2} resulted in an approximately 5-log reduction of *F. oxysporum*, and *F. moniliforme*; and 3-log reduction of *F. solani* (Fig. 3B). APDT with NMBN and fluences of 10 and 15 J cm^{-2} resulted in an approximately 5-log reduction of *F. oxysporum* (5 μM); and *F. moniliforme* (10 μM); and

4.5-log reduction of *F. solani* (12.5 μM) (Fig. 3C). APDT with S137 (10 μM) and fluences of 10 and 15 J cm^{-2} resulted in an approximately 5-log reduction of *F. oxysporum*, and *F. solani*; and 4.5 and 5-log reduction of *F. moniliforme* (Fig. 3D). The washing of the germinated microconidia to remove unbound PS before light exposure reduced the effect of APDT for MB at the fluence of 10 J cm^{-2} for *F. oxysporum* ($P < 0.05$). For the other treatments, the reductions were not significant ($P > 0.05$) (Fig. 3).

3.4. Subcellular Localization of the PS in Ungerminated and Germinated Microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani*

Microscopic studies were performed to determine the subcellular localization of each PS in ungerminated and germinated microconidia of all *Fusarium* species. The internalization of TBO and NMBN was observed in ungerminated microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani*, whereas the germinated microconidia of these fungi species showed the internalization of MB, TBO, and NMBN (Figs. 4, 5 and 6). The localization of FM4-64 with the PS TBO and NMBN in ungerminated microconidia and with MB, TBO and NMBN in germinated microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani* indicated the possible accumulation of the PS in membranous structures such as small vacuoles present in the cytoplasm of the microconidia and

Fig. 5. Microscopy study with *Fusarium moniliforme* ungerminated and germinated microconidia non-stained (A and I), stained with DAPI (B and J), stained FM®4-64 (C and K) and merged image (D and L) using the Leica Application Suite X software. Ungerminated and germinated microconidia were also treated with MB 100 µM (E and M), NMBN 100 µM (F and N), TBO 100 µM (G and O), and S137 100 µM (H and P).

germlings (Figs. 4, 5 and 6). Additionally, it was observed by FM4-64 cell staining that the treatment with S137 at 100 µM caused cytoplasmic disorganization and formation of large vesicles in the cytoplasm of the germlings (Figs. 4 and 6).

3.5. Evaluation of APDT Effect on Cell Membrane Permeability

Propidium iodide (PI) is a membrane-impermeable compound that is not retained inside viable cells. Damage in cell membrane increases PI uptake. The effect of APDT on microconidia cell membrane permeability was evaluated in all *Fusarium* species. Exposures only to red light did not change the cell membrane permeability of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani* microconidia ($P > 0.05$ for all *Fusarium* species and fluences) (Figs. 7, 8, and 9). In the absence of light, only the treatment with S137 increased the percentage of cells stained with PI. The percentages of cells stained were 81.5%, 97.3% and 96.8% for the microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani*, respectively ($P < 0.05$ for all *Fusarium* species). Despite the increase in the permeability of the membrane, such treatment killed <7% of the conidia of the three species. APDT with all the PS and fluences increased cell membrane permeability for the three *Fusarium*

species ($P < 0.05$ for all treatment comparisons). The greatest membrane permeability increase was observed after APDT with NMBN and S137 (Figs. 7, 8, and 9). APDT with MB and TBO increased the membrane permeability of *F. solani* microconidia (Fig. 9). The percentage of cells stained with PI in the death controls was at least 98% for all *Fusarium* species ($P < 0.05$).

3.6. Effects of APDT on Lipid Peroxidation of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani* Microconidia

Reactive oxygen species (ROS), such as singlet oxygen, produced during the photochemical process of APDT may result in oxidative damage of lipids present in the microconidia. We evaluated the lipid peroxidation (MDA product) after APDT experiments with all PS at the fluence of 15 J cm^{-2} . Exposures only to red light, and treatments only with the PS in the absence of red light did not increase lipid peroxidation in microconidia of any *Fusarium* species ($P > 0.05$ for all *Fusarium* species) (Fig. 10). Increases in lipid peroxidation in microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani* were observed only after APDT with NMBN and S137 ($P < 0.05$) (Fig. 10).

Fig. 6. *Fusarium solani* ungerminated and germinated microconidia non-stained (A and I), stained with DAPI (B and J), stained with FM®4-64 (C and K) and merged image (D and L) using the Leica Application Suite X software. Ungerminated and germinated microconidia were also treated with MB 100 µM (E and M), NMBN 100 µM (F and N), TBO 100 µM (G and O), and S137 100 µM (H and P). Arrows indicate the large vesicles formed in the cytoplasm of the germinated microconidia after treatment with S137 (P).

4. Discussion

Phenothiazinium dyes are among the most commonly used PS in APDT against fungal species and novel derivatives, such as NMBN, the pentacyclic S137, and derivatives with basic side chains, which are more effective than the lead compound MB, are still being identified [30,33,37–40]. APDT with the PS MB and TBO have been used to kill fungi of several genera including *Kluyveromyces* [41], *Candida* [33, 42], *Metarhizium* and *Aspergillus* [32]. To our knowledge, there are no data regarding the effect of APDT with phenothiazinium PS such as MB, TBO, NMBN and S137 on *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani*.

As the MIC based experiments were less time-consuming and allowed the evaluation of several treatments simultaneously, this approach is very convenient to establish the best conditions for APDT [30,31,33] and was used in the present work. NMBN and S137 were the most effective PS, being associated with the lowest MIC for all *Fusarium* species. Only S137 presented dark toxicity to the fungal cells. The improved performance of NMBN and S137 in comparison with other phenothiazinium PS was also observed in vitro for the human-

pathogenic fungi *Candida* spp. and *Trichophyton* spp., and for the plant-pathogenic fungi *Colletotrichum* spp. [30,31,33].

After the establishment of optimized conditions for APDT based on the initial MIC experiments, we evaluated the effect of APDT with all PS (MB, TBO, NMBN, and S137) on the survival of ungerminated and germinated conidia. APDT was very effective in killing both ungerminated and germinated microconidia of the three *Fusarium* species. Treatment with NMBN and red light (15 J cm^{-2}) resulted in approximately 5-log reduction in the survival of ungerminated and germinated microconidia, which is the maximum reduction that could be determined with the experimental design. APDT with S137 also resulted in the same reduction (5-log) to *F. oxysporum* and *F. solani*. However, for *F. moniliforme* treatment APDT with S137 resulted in approximately 3-log reduction in survival both to ungerminated and germinated microconidia.

As opposed to some currently used fungicides that act only on metabolically active cells and/or exhibit only fungistatic effects, APDT with phenothiazinium PS (MB, TBO, NMBN and S137) killed both the quiescent ungerminated microconidia and the metabolic active germings of all *Fusarium* spp. The use of APDT to kill microconidia of *Fusarium*

Fig. 7. Percentage of cells stained with PI (gray columns) and survival fraction (white squares) of *F. oxysporum* microconidia after APDT with MB (A), TBO (B), NMBN (C), and S137 (D). Error bars are standard deviation of three independent experiments.

spp. on seeds, seedling, fruits and vegetables would reduce the inoculum in the treated area. Reduction of the initial inoculum is among the strategies used to control diseases caused by *Fusarium* species [5,6,20,43].

Washing the conidia to remove unbound PS from the ungerminated microconidia before red light exposure (15 J cm⁻²) reduced the effect of APDT with phenothiazinium PS. However, the reduction was smaller for S137. This effect was previously observed in APDT with MB and TBO on

Fig. 8. Percentage of cells stained with PI (gray columns) and survival fraction (white squares) of *F. moniliforme* microconidia after APDT with MB (A), TBO (B), NMBN (C), and S137 (D). Error bars are standard deviation of three independent experiments.

Fig. 9. Percentage of cells stained with PI (gray columns) and survival fraction (white squares) of *F. solani* microconidia after APDT with MB (A), TBO (B), NMBN (C), and S137 (D). Error bars are standard deviation of three independent experiments.

Aspergillus nidulans conidia [32]. As opposed to what was observed in ungerminated microconidia, washing the germinated microconidia did not reduce the effect of the APDT (at fluence of 15 J cm⁻²) with all PS on the three *Fusarium* species.

Conidial germination can be divided into three stages. The first is the activation of the resting conidia by appropriate environmental factors such as exogenous low-molecular nutrients (i.e. sugar and amino acids). Activation is followed by isotropic growth which is the first morphological change that can be observed during germination and that involves water uptake and cell wall growth. It occurs simultaneously with the resumption of numerous metabolic activities including respiration, and RNA and protein synthesis and results in a cell whose diameter is two to several times that of the resting conidia [15,16,18]. The last stage is the polarized growth which ends with the formation of a germ tube [13]. After 4 h in culture media, microconidia of all the three *Fusarium* species are in the second phase of the germination because isotropic growth is evident but no nuclear division or germ tube emergence can be observed (see Figs. 4, 5 and 6). Microscopic studies showed that ungerminated and germinated microconidia interact differently with the PS. TBO and NMBN but not MB were taken up by undergerminated microconidia and accumulated in uncharacterized cytoplasmic vesicles in all *Fusarium* species. After germination, MB, TBO and NMBN entered and accumulated in structures present in the cytoplasm of the germings of all three species. Staining the cells with FM4-64, which has affinity for membranes, indicates that the PS accumulates in vacuoles present in the cytoplasm. Study using Sudan III and FM4-64 showed that NMBN has affinity for lipid bodies and small vesicles present in the cytoplasm of the conidia of *Colletotrichum acutatum* [31]. The PS entry and accumulation occurred only in contact with the ungerminated and germinated microconidia and were independent of red light exposure. MB and S137 were not visible inside the ungerminated microconidia in any *Fusarium* species. Although the accumulation of S137 was not observed in any structure inside the germings, APDT with S137 at 100 μ M caused the formation of large vesicles in the cytoplasm of the *F. oxysporum* and *F. solani* (see Figs. 4 and 6).

It was previously observed that treatment with S137 caused cytoplasmic disorganization and formation of large vesicles in the cytoplasm of conidia of *C. acutatum* [31]. The disorganization of membranous cytoplasmic vesicles might be the reason for the higher dark toxicity of S137. These structures are particularly important in the early stages of conidia germination, having a role, for example, in the osmotic regulation, protein sorting and lipid storage [44–47]. The internalization of S137 only in germings could be responsible for the greater effectiveness of APDT in germings as compared to ungerminated microconidia.

Several studies have shown that the cell membrane is one of the targets of ROS generated during the photodynamic process [41,48–51]. PI is widely used to evaluate the membrane integrity [52,53]. APDT with all PS increased the membrane permeability of microconidia of the three *Fusarium* species. Only treatment with S137 increased the permeability in the dark, however, the viability of the microconidia of the three species remained higher than 95%. The increase in the membrane permeability without causing cell death was previously observed in *Saccharomyces cerevisiae* [54]. S137 is more lipophilic in comparison to the other studied compounds [55–57]. This could explain the increased permeability of the cell membrane observed after treatment with S137 in the dark [55–57]. Also, the greater affinity for lipids facilitates the interaction of S137 and NMBN with the cell membranes and increases the oxidation of their lipids during the APDT. As expected, APDT with NMBN and S137 increased lipid peroxidation in all *Fusarium* species. A previous study showed an increase in lipid peroxidation after the photodynamic treatment of conidia of *F. poae* and *F. culmorum* using the lipophilic protoporphyrin IX as PS [58].

The use of APDT in the environment will require environmentally safe PS. Phenothiazinium PS present low toxicity to mammals. MB has been used to treat methemoglobinemia and in oral disinfection [59,60]. Other PS, such as hypericin, furanocoumarins and thiophenes are produced by plants of various genera and have been used in vitro to kill plant-pathogenic fungi, such as *Colletotrichum* sp. and *Fusarium* sp. [27,35,58], and foodborne pathogenic bacteria, such as *Bacillus*, *Listeria*, and *Salmonella* [25,61]. The present study showed that in vitro

Fig. 10. Peroxidation of microconidia lipids measured by the formation of malondialdehyde (gray columns) and survival fraction (white squares) after APDT with MB, TBO, NMBN, and S137 of: (A) *Fusarium oxysporum*, (B) *F. moniliforme*, and (C) *F. solani*. Error bars are standard deviation of three independent experiments.

APDT with the four phenothiazinium PS (MB, TBO, NMBN, and S137) were very effective in killing both ungerminated and germinated microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and *F. solani*. Thus, APDT has a great potential to reduce the inoculum of these fungi on seeds, seedling, fruits and vegetables.

5. Conclusion

Photodynamic treatment with phenothiazinium PS efficiently kills both the quiescent ungerminated microconidia and metabolically active germinated microconidia of *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, and *F. solani*. However, further studies should be conducted under realistic conditions (*in planta*) in order to establish the safety of this approach and the best conditions for the antimicrobial photodynamic treatment required for each pathosystem.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.09.008>.

Acknowledgments

We thank Eduardo Tozatto for technical assistance with confocal microscopy, Fabiana Rossetto de Moraes for technical assistance with flow cytometry and Gabriela Braga Rodrigues for supplying the FUN-1 stain. This work was supported by the Grants 2015/05853-7 and 2012/15204-8 from the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP). We sincerely thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the PhD fellowship 162149/2015-8 to Henrique Dantas de Menezes.

References

- [1] P.N. Nelson, C. Dignani, E.J. Anaissie, Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species, Clin. Microbiol. Rev. 7 (1994) 479–504.
- [2] J. Evans, D. Levesque, A. de Lahunta, H.E. Jensen, Intracranial fusariosis: a novel cause of fungal meningoencephalitis in a dog, Vet. Pathol. 41 (2004) 510–514.

- [3] A.D. van Diepeningen, P. Feng, S. Ahmed, M. Sudhadham, S. Bunyaratavej, G.S. Hoog, Spectrum of *Fusarium* infections in tropical dermatology evidenced by multilocus sequencing typing diagnostics, *Mycoses* 58 (2015) 48–57.
- [4] M. Ortoneda, J. Guarro, M.P. Madrid, Z. Caracul, M.I.G. Roncero, E. Mayayo, A. Di Pietro, *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetics dissection of fungal virulence in plants and mammals, *Infect. Immun.* 72 (2004) 1760–1766.
- [5] R.J. McGovern, Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*, *Crop. Prot.* 73 (2015) 78–92.
- [6] T.R. Gordon, C.L. Swett, M.J. Wingfield, Management of *Fusarium* diseases affecting conifers, *Crop. Prot.* 73 (2015) 28–39.
- [7] B. Scherm, V. Balmas, F. Spanu, G. Pain, G. Delogu, M. Pasquali, Q. Migheli, *Fusarium culmorum*: casual agent of foot and root rot and head blight on wheat, *Mol. Plant Pathol.* 14 (2013) 323–341.
- [8] K.A. Wolny-Koladka, The prevalence of selected genes involved in the biosynthesis of trichothecenes assessed with the specific PCR test in *Fusarium* spp. isolated from cereals in southern Poland, *J. Environ. Sci. Health B* 50 (2015) 361–367.
- [9] E. Guilhermetti, G. Takahachi, C.S. Shinobu, T.I.E. Svidzinski, *Fusarium* spp. as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts, *Int. J. Dermatol.* 46 (2007) 822–828.
- [10] C.Y. Wu, G.S. Chen, C.C. Lan, Onychomycosis caused by *Fusarium solani* in a woman with diabetes, *Clin. Exp. Dermatol.* 34 (2009) e772–e774.
- [11] É. Nascimento, S.H. da Silva, E.R. Marques, D.W. Roberts, G.U.L. Braga, Quantification of cyclobutane pyrimidine dimers induced by UVB radiation in conidia of the fungi *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium robertsii*, *Photochem. Photobiol.* 86 (2010) 1259–1266.
- [12] H.D. de Menezes, N.S. Massola Jr., S.D. Flint, G.J. Silva Jr., L. Bachmann, D.E.N. Rangel, G.U.L. Braga, Growth under visible light increases conidia and mucilage production and tolerance to UV-B radiation in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum*, *Photochem. Photobiol.* 91 (2015) 397–402.
- [13] C. d'Enfert, Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*, *Fungal Genet. Biol.* 21 (1997) 163–172.
- [14] R. Belaish, H. Sharon, E. Leviansky, S. Greenstein, Y. Shadkhan, N. Osherov, The *Aspergillus nidulans* *cetA* and *calA* genes are involved in conidial germination and cell wall morphogenesis, *Fungal Genet. Biol.* 45 (2008) 232–242.
- [15] G.U.L. Braga, R.H.R. Destéfano, C.L. Messias, Oxygen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on different carbon sources, *J. Invertebr. Pathol.* 74 (1999) 112–119.
- [16] F. Lledias, P. Rangel, W. Hansberg, Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1396–1404.
- [17] K.Y. Seong, X. Zhao, J.R. Xu, U. Güldener, H.C. Kistler, Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*, *Fungal Genet. Biol.* 45 (2008) 389–399.
- [18] Y.T. Oh, C.S. Ahn, J.G. Kim, H.S. Ro, C.W. Lee, J.W. Kim, Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*, *Fungal Genet. Biol.* 47 (2010) 246–253.
- [19] G.M. Deng, Q.S. Yang, W.D. He, C.Y. Li, J. Yang, C.W. Zuo, J. Gao, O. Sheng, S.Y. Lu, S. Zhang, G.J. Yi, Proteomic analysis of conidia germination in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 reveals new targets in ergosterol biosynthesis pathway for controlling *Fusarium* wilt of banana, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 7189–7207.
- [20] S.T. Koike, T.R. Gordon, Management of *Fusarium* wilt of strawberry, *Crop. Prot.* 73 (2015) 67–72.
- [21] T.W. Allen, S.A. Enebak, W.A. Carey, Evaluation of fungicides for control of species of *Fusarium* on longleaf pine seed, *Crop. Prot.* 23 (2004) 979–982.
- [22] J. Amini, D.F. Sidovich, The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato, *J. Plant Prot. Res.* 50 (2010) 172–178.
- [23] C.C. Amarasinghe, L. Tamburic-Illincic, J. Gilbert, A.L. Brûlé-Babel, W.G.D. Fernando, Evaluation of different fungicides for control of fusarium head blight in wheat inoculated with 3ADON and 15ADON chemotypes of *Fusarium graminearum* in Canada, *Can. J. Plant Pathol.* 35 (2013) 200–208.
- [24] H. Ölmez, U. Kretschmar, Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact, *LWT - Food. Sci. Technol.* 42 (2009) 686–693.
- [25] K. Aponiene, E. Paskeviciute, I. Reklaitis, Z. Luksiene, Reduction of microbial contamination of fruits and vegetables by hypericin-based photosensitization: comparison with other emerging antimicrobial treatments, *J. Food Eng.* 144 (2015) 29–35.
- [26] T. Dai, B.B. Fuchs, J.J. Coleman, R.A. Prates, C. Astrakas, T.G. St. Denis, M.S. Ribeiro, E. Mylonakis, M.R. Hamblin, G.P. Tegos, Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform, *Front. Microbiol.* 3 (2012) 1–16.
- [27] H.D. de Menezes, A.C. Pereira, G.T.P. Brancini, H.C. Leão, N.S. Massola Jr., L. Bachmann, M. Wainwright, J.K. Bastos, G.U.L. Braga, Furocoumarins and coumarins photoinactivate *Colletotrichum acutatum* and *Aspergillus nidulans* fungi under solar radiation, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 131 (2014) 74–83.
- [28] G. Jori, Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 25 (2006) 505–519.
- [29] P. Calzavara-Pinton, M.T. Rossi, R. Sala, M. Venturini, Photodynamic antifungal chemotherapy, *Photochem. Photobiol.* 88 (2012) 512–522.
- [30] G.B. Rodrigues, M. Dias-Baruffi, N. Holman, M. Wainwright, G.U.L. Braga, *In vitro* photodynamic inactivation of *Candida* species and mouse fibroblasts with phenothiazinium photosensitizers and red light, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 10 (2013) 141–149.
- [31] H.D. de Menezes, G.B. Rodrigues, S.P. Teixeira, N.S. Massola Jr., L. Bachmann, M. Wainwright, G.U.L. Braga, *In vitro* photodynamic inactivation of plant-pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with novel phenothiazinium photosensitizers, *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (2014) 1623–1632.
- [32] F.P. Gonzales, S.H. da Silva, D.W. Roberts, G.U.L. Braga, Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue, *Photochem. Photobiol.* 86 (2010) 653–661.
- [33] G.B. Rodrigues, L.K.S. Ferreira, M. Wainwright, G.U.L. Braga, Susceptibilities of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light, *Photochem. Photobiol. B Biol.* 116 (2012) 89–94.
- [34] F. DiCosmo, G.H.N. Towers, J. Lam, Photo-induced fungicidal activity elicited by naturally occurring thiophene derivatives, *Pestic. Sci.* 13 (1982) 589–594.
- [35] G. Bourque, J.T. Arnason, C. Madhosingh, W. Orr, The photosensitization of the plant pathogen *Fusarium culmorum* by phenylheptatriyne from *Bidens pilosa*, *Can. J. Bot.* 63 (1985) 899–902.
- [36] Z. Lukšienė, D. Pečiulytė, A. Lugauskas, Inactivation of fungi *in vitro* by photosensitization: preliminary results, *Ann. Agric. Environ. Med.* 11 (2004) 215–220.
- [37] M. Wainwright, K. Meegan, C. Loughran, Phenothiazine photosensitizers IX. Tetra- and pentacyclic derivatives as photoantimicrobial agents, *Dyes Pigm.* 91 (2011) 1–5.
- [38] M. Wainwright, K.B. Crossley, Methylene blue — a therapeutic dye for all seasons? *J. Chemother.* 14 (2002) 431–443.
- [39] M. Wainwright, K. Meegan, C. Loughran, R.M. Giddens, Phenothiazinium photosensitizers VI. Photobactericidal asymmetric derivatives, *Dyes Pigm.* 82 (2009) 387–391.
- [40] M. Wainwright, J. Antczak, M. Baca, C. Loughran, K. Meegan, Phenothiazinium photoantimicrobials with basic side chains, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 150 (2015) 38–43.
- [41] M. Paardekooper, A.W.D. Bruijne, J.V. Steveninck, P.J.A. den Broek, Inhibition of transport systems in yeast by photodynamic treatment with Toluidine blue, *Biochim. Biophys. Acta* 1151 (1993) 143–148.
- [42] M.C. Teichert, J.W. Jones, M.N. Usacheva, M.A. Biel, Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in immunodeficient murine model, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 93 (2002) 155–160.
- [43] R.R. Sharma, D. Singh, R. Singh, Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review, *Biol. Control* 50 (2009) 205–221.
- [44] D.J. Klionsky, P.K. Herman, S.D. EMR, The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis, *Microbiol. Rev.* 54 (1990) 266–292.
- [45] P.M. Kane, The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (2006) 177–191.
- [46] V. Veses, A. Richards, N.A. Gow, Vacuoles and fungal biology, *Curr. Opin. Microbiol.* 11 (2008) 503–513.
- [47] H. Kim, K.W. Kim, S. Yun, Multiple roles of a putative vacuolar protein sorting associated protein 74, FgVPS74, in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*, *J. Microbiol.* 53 (2015) 243–249.
- [48] T.I. Rokitskaya, M. Block, Y.N. Antonenko, E.A. Kotova, P. Pohl, Photosensitizer binding to lipid bilayers as a precondition for the photoinactivation of membrane channels, *Biophys. J.* 78 (2000) 2572–2580.
- [49] S. Ben-Dror, I. Bronshtein, A. Wiehe, B. Röder, M.O. Senge, B. Ehrenberg, On the correlation between hydrophobicity, liposome binding and cellular uptake of porphyrin sensitizers, *Photochem. Photobiol.* 82 (2006) 695–701.
- [50] C. Pavan, A.F. Uchoa, C.S. Oliveira, Y. Iamamoto, M.S. Baptista, Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (2009) 233–240.
- [51] R.M. Cordeiro, R. Miotto, M.S. Baptista, Photodynamic efficiency of cationic mesoporphyrins at lipid bilayers: insights from molecular dynamics simulations, *J. Phys. Chem. B* 116 (2012) 14618–14627.
- [52] C.J. Hewitt, G. Nebe-Von-Caron, An industrial application of multiparameter flow cytometry: assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations, *Cytometry* 44 (2001) 179–187.
- [53] I.B. Rossetti, L.R. Chagas, M.S. Costa, Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability, *Lasers Med. Sci.* 29 (2014) 1059–1064.
- [54] H.M. Davey, P. Hexley, Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide, *Environ. Microbiol.* 13 (2011) 163–171.
- [55] B.B. Noodt, G.H. Rodal, M. Wainwright, Q. Peng, R. Horobin, J.M. Nesland, K. Berg, Apoptosis induction by different pathways with methylene blue derivative and light from mitochondrial sites in V79 cells, *Int. J. Cancer* 75 (1998) 941–948.
- [56] M. Wainwright, The development of phenothiazinium photosensitizers, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2 (2005) 263–272.
- [57] I.O.L. Bacellar, C. Pavan, E.M. Sales, R. Itri, M. Wainwright, M.S. Baptista, Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers, *Photochem. Photobiol.* 90 (2014) 801–813.
- [58] A.V. Vorobey, S.V. Pinchuk, Photodamage to spores of *Fusarium* fungi sensitized by protoporphyrin IX, *Biophysics* 53 (2008) 386–389.
- [59] R. Andersen, N. Loebe, D. Hammond, M. Wilson, Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planning, *J. Clin. Dent.* 18 (2007) 34–38.
- [60] M. Wainwright, H. Smalley, O. Scully, E. Lotfipour, Comparative photodynamic evaluation of new phenothiazinium derivatives against *Propionibacterium acnes*, *Photochem. Photobiol.* 88 (2012) 523–526.
- [61] K. Kairyte, S. Lapinskas, V. Gudelis, Z. Luksiene, Effective inactivation of food pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* by combined treatment of hypericin-based photosensitization and high power pulsed light, *J. Appl. Microbiol.* 112 (2012) 1144–1151.