UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Tratamento fotodinâmico antimicrobiano de *Colletotrichum acutatum* *in vitro* e
in planta com fotossensibilizadores fenotiazínicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia

Orientada: Júlia Cunha Gonzales

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite
Braga

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Biociências Aplicado à Farmácia,
em 14/06/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2016

RESUMO

GONZALES, J. C. **Tratamento fotodinâmico antimicrobiano de *Colletotrichum acutatum* *in vitro* e *in planta* com fotossensibilizadores fenotiazínicos.** 2016. 143f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O aumento da tolerância aos fungicidas convencionais, observado em diversos gêneros de fungos de interesse, e a preocupação crescente com o meio ambiente têm estimulado o desenvolvimento de novas alternativas para o controle de fitopatógenos. Dentre as novas estratégias antimicrobianas que têm sido avaliadas, o tratamento fotodinâmico antimicrobiano (TFA) é uma das mais promissoras. O TFA baseia-se no uso de um fotossensibilizador (FS) que se acumula seletivamente nas células do microrganismo alvo. A ativação do FS pela luz, na presença de oxigênio molecular, induz à formação de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete, que provocam a morte do microrganismo alvo, com poucos danos ao hospedeiro. Apesar de muito promissor, o TFA ainda não foi explorado para o controle de fitopatógenos. No presente estudo, foi avaliada, *in planta*, a eficácia do TFA com o fotossensibilizador azul de metileno (MB) e radiação solar em conídios do fungo fitopatogênico *Colletotrichum acutatum*. Os experimentos foram conduzidos com MB de diferentes fabricantes, em duas concentrações (25 e 50 μM) e em diferentes formulações, ao longo das diferentes estações do ano, em dias com e sem nebulosidade e em diferentes temperaturas. O TFA com MB e radiação solar foi extremamente eficaz, matando aproximadamente 100% dos conídios em todas as condições avaliadas. Os efeitos da aplicação do MB na planta hospedeira *Citrus sinensis* também foram avaliados. O FS foi aplicado repetidas vezes em folhas e em flores de mudas de laranjeira. Nenhum dano foi observado nas folhas ou nas pétalas após os tratamentos com o MB. Pela primeira vez, foi feito o estudo mecanístico dos efeitos do TFA com MB em conídios de *C. acutatum*. Foram avaliados os efeitos do TFA na permeabilidade da membrana plasmática dos conídios e na formação de espécies reativas de oxigênio tardias, por meio da utilização das sondas fluorescentes iodeto de propídio (PI) e dihidroetídio (DHE), respectivamente. O TFA com MB danificou a membrana plasmática, reduzindo a sua permeabilidade seletiva e induziu a formação de espécies reativas de oxigênio tardias nos conídios. Também foi conduzido um estudo de longa duração, no qual foi avaliada a tolerância dos conídios de *C. acutatum* ao TFA com o novo azul de metileno, após cada um de 45 ciclos sucessivos de TFA, seguido pela seleção dos sobreviventes. Foram observados aumentos gradativos na tolerância ao TFA a partir do 21º ciclo de seleção. Além do aumento na tolerância, também foi observado um aumento da pigmentação dos conídios, provavelmente decorrente da seleção de mutantes que acumulam mais carotenóides.

Palavras-chave: Tratamento fotodinâmico antimicrobiano, Azul de metileno, Novo azul de metileno, *Colletotrichum acutatum*, *Citrus sinensis*, Tolerância ao tratamento fotodinâmico.

1. INTRODUÇÃO

A aplicação intensiva de fungicidas sintéticos é o método mais utilizado para o controle da antracnose e da podridão floral dos citros (PFC), que são doenças causadas por espécies de *Colletotrichum*. Entretanto, nem sempre é possível evitar a ocorrência de epidemias causadas pelos fungos, devido, principalmente, à emergência de isolados tolerantes aos fungicidas disponíveis e à aplicação inadequada dos produtos (AZEVEDO et al., 2006; De MENEZES et al., 2014a; FERNANDES; SANTOS; RIBEIRO, 2002; LANDUM et al., 2016). Adicionalmente, o uso intensivo e/ou inapropriado dos fungicidas químicos para o controle de doenças, tanto no pré como no pós-colheita, tem provocado intoxicação de homens e animais e contaminação de alimentos e do ambiente (GHINI; KIMATI, 2000; De MENEZES et al., 2014b). Nesse contexto, o desenvolvimento de novas abordagens para o controle de fitopatógenos é extremamente desejável. O tratamento fotodinâmico antimicrobiano (TFA) é uma estratégia promissora, que pode ser utilizada tanto para controlar micoses localizadas como para matar microrganismos patogênicos no meio ambiente. O processo baseia-se no uso de um fotossensibilizador (FS), que se acumula nas células do microrganismo-alvo. A excitação do FS por comprimentos de onda apropriados dá início a reações fotoquímicas que podem produzir diversas espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio singlete, o radical hidroxila e peróxidos, provocando danos oxidativos não específicos que causam a morte do microrganismo sem grandes danos ao hospedeiro. Em comparação com a maioria dos fungicidas atualmente utilizados, os múltiplos alvo das EROs reduzem a chance da seleção de linhagens tolerantes ao TFA. Adicionalmente, os FS utilizados no TFA são muito menos tóxicos ao ser humano e aos animais e muito menos agressivos ao meio ambiente do que os defensivos utilizados. Uma vantagem adicional do TFA é que, diferentemente de diversos fungicidas convencionais que só atuam em células metabolicamente ativas, ele é capaz de matar células metabolicamente inativas, como os esporos bacterianos (EICHNER et al., 2015; LUKSIENE; BUCHOVEC; PASKEVICIUTE, 2010a, b; LUKSIENE; BUCHOVEC; PASKEVICIUTE, 2009) e os conídios de fungos filamentosos (De MENEZES et al., 2014a, b; RODRIGUES et al., 2012; GOMES et al., 2011; GONZALES et al., 2010).

Os pré-requisitos para o uso do TFA para o controle de fungos patógenos de plantas incluem a identificação de FS efetivos contra as diferentes espécies e a avaliação dos possíveis efeitos colaterais nas plantas hospedeiras e no meio ambiente (De MENEZES et al., 2014a, b). A identificação e o desenvolvimento de FS com potencial para serem empregados

como antimicrobianos terão aplicações importantes e serão de extrema utilidade para o desenvolvimento de novos fungicidas com mecanismo de ação diferente dos fungicidas atualmente utilizados e para os quais a seleção de microrganismos tolerantes seja menos provável (MELO; PERUSSI, 2012; De SOUZA et al., 2006; VERA et al., 2012).

1.1 *Colletotrichum acutatum*

Os fungos filamentosos do gênero *Colletotrichum* (teleomorfo: *Glomerella*) pertencem ao filo *Ascomycota* e estão entre os mais importantes e bem sucedidos fitopatógenos (BAILEY; JEGER, 1992; FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998). Essas espécies causam prejuízos econômicos significativos em culturas de climas tropicais, subtropicais e temperados. *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds é uma das espécies mais importantes do gênero (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). Essa espécie cosmopolita causa grandes perdas agrícolas e pode produzir sintomas nas flores, folhas, pecíolos, raízes e frutos. Entre as muitas espécies afetadas pelo *C. acutatum* incluem-se maçãs, mangas, papaias, abacates e as diversas espécies de citros (PERES et al., 2005). A principal doença causada por *Colletotrichum* é a antracnose, que ocorre no pós-colheita, e pode levar a perdas de até 30% dos produtos comercializados (ALMEIDA, 2002; SILVA et al., 2006). A doença é caracterizada pelo aparecimento de lesões arredondadas, grandes, necróticas, com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada. Também pode ocorrer o aparecimento de uma lesão mole, o que prejudica a comercialização dos frutos (LIMA FILHO; OLIVEIRA; MENEZES, 2003; SILVA et al., 2014). Além da antracnose, espécies de *Colletotrichum* também causam a podridão floral dos citros (PFC). A doença é comumente associada ao fungo *C. acutatum* e caracteriza-se pela presença de manchas ou lesões laranja-amarronzadas nas pétalas das flores abertas. Após a infecção, os frutos recém-formados caem (ROBERTO; BORGES, 2001; SILVA et al., 2014; TIMMER et al., 1994).

Dentre as espécies de citros mais afetadas pela PFC estão as laranjas doces (*Citrus sinensis*), como a laranja 'Valência'. Essas variedades ditas tardias são mais sujeitas ao ataque do fungo do que as outras, pois apresentam ao longo do ano vários surtos de florescimento (SPÓSITO et al., 2006). O *C. acutatum* possui um ciclo de vida único nas laranjas doces. Nessas plantas, o fungo assume duas formas de parasitismo: a forma biotrófica (com pouco ou nenhum dano aparente para o hospedeiro), que ocorre nas folhas, e a forma necrotrófica (o fungo provoca morte das células do hospedeiro), que ocorre nas flores (PERES et al., 2005). Nas folhas, os conídios do fungo formam estruturas de adesão e de persistência, chamadas

apressórios. Quando ocorre o florescimento, a água das chuvas transporta os extratos das flores para as folhas. Esses extratos induzem à germinação do apressório que forma conídios secundários (LEANDRO et al., 2001). Respingos de chuvas transportam esses conídios para as flores, onde germinam e colonizam as pétalas, produzindo conídios primários em acérvulos (conidióforos). Durante a produção dos conídios, ocorre, simultaneamente, a produção de uma matriz gelatinosa que os envolve, constituída predominantemente por polissacarídeos e proteínas solúveis em água. A dispersão dos conídios ocorre pela água da chuva ou de irrigação, por insetos, vento, utensílios agrícolas e manuseio das culturas (De MENEZES et al., 2015; WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). Os sintomas da podridão floral dos citros incluem manchas escuras nas flores, queda prematura dos frutos e persistência dos cálices (PERES et al., 2005). O esquema ilustrativo que demonstra o ciclo da podridão floral dos citros está apresentado na Figura 1.

Figura 1. Esquema ilustrativo que demonstra o ciclo da doença Podridão floral dos citros (modificado de PERES et al., 2005)

A PFC foi registrada em quase toda a citricultura das Américas no final das décadas de 70 e 80. A doença atingiu severamente as principais regiões produtoras do Estado de São

Paulo nas safras de 1991/92, 1992/93 e 1993/94, causando perdas de até 80% da produção (ROBERTO; BORGES, 2001; SILVA et al., 2014). Nas safras 2009/2010, a PFC ocorreu de forma muito severa, devido às condições climáticas. Na região Sudeste, a redução na produção atingiu valores de 85% (SILVA Jr, 2011). Segundo pesquisadores do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), em 2012, os citricultores paulistas vivenciaram um dos seus piores anos e os efeitos dessa crise se estenderam para 2013 (BARROS et al., 2013). A citricultura representa um dos mais importantes segmentos na estrutura socioeconômica do Brasil. O Brasil detém 50% da produção mundial de suco de laranja e exporta 98% do que produz. O PIB do setor citrícola é de US\$ 6,5 bilhões (2009), sendo US\$ 4,39 bilhões no mercado interno e US\$ 2,15 bilhões no mercado externo. A citricultura gera, entre empregos diretos e indiretos, um contingente de 230 mil posições e uma massa salarial anual de R\$ 676 milhões. Atualmente, o setor vem enfrentando uma grave crise, pois o custo operacional de produção dos pomares da indústria, que era de R\$ 4,25/caixa em 2002/2003, aumentou para aproximadamente R\$ 13,64 em 2016. Pragas e doenças foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores nesta década e por perdas de quase 80 milhões de caixas por ano (NEVES et al., 2010).

As estratégias para o controle da PFC baseiam-se principalmente na aplicação intensiva de fungicidas durante todo o período de floração (SILVA Jr. et al., 2011; TIMMER; PERES, 2015). Os fungicidas registrados no Brasil incluem produtos pertencentes aos grupos químicos benzimidazóis (carbendazim e tiofanato metílico), triazóis (difenoconazole e tebuconazole), dicarboximida e misturas formuladas (estrobilurinas + triazol, oxazolidinadiona + ditiocarbamato) (BRASIL, 2011). Entretanto, problemas no controle da doença têm sido observados, principalmente devido à emergência de linhagens tolerantes a fungicidas (WONG et al., 2008; WONG et al., 2007; PERES et al., 2010; DEISING et al., 2008; TIMMER; PERES, 2015). Adicionalmente, a crescente preocupação com a saúde humana e animal e com o meio ambiente tem levado a legislações cada vez mais restritivas em relação ao uso de fungicidas. Diversos produtos foram banidos do mercado devido à sua elevada toxicidade, que representa riscos para o consumidor e para todo o meio ambiente (TIMMER; PERES, 2015). A emergência de linhagens de fungos tolerantes aos fungicidas atualmente utilizados, o fato de só existirem quatro grupos químicos registrados para o controle da PFC e a necessidade de estratégias para o controle de fitopatógenos que sejam menos tóxicas aos consumidores de produtos agrícolas e ao meio ambiente têm estimulado a busca por novas estratégias para o controle de fungos fitopatogênicos.

1.2 Fotossensibilizadores

Fotossensibilizadores são compostos atóxicos ou pouco tóxicos, normalmente inativos em seu estado fundamental, que absorvem luz, preferencialmente na região da radiação visível (DOUGHERTY, 1993). Quando o FS é exposto à luz, com comprimentos de onda apropriados, sua molécula é excitada, iniciando reações que podem levar à produção de diversas espécies reativas de oxigênio, incluindo-se o oxigênio singlete, que é extremamente reativo e citotóxico (SOUKOS et al., 1998, JUZENAS; MOAN, 2006). Propriedades físico-químicas dos FS, como carga, lipo e hidrossolubilidade, são muito importantes para a eficácia da fotossensibilização (FUCHS et al., 2007). A especificidade pela célula-alvo, o curto intervalo de tempo entre a aplicação do FS e a sua máxima captação pelas células-alvo, a exclusão pelas células não-alvo, a ativação num comprimento de onda considerado ótimo para a absorção celular e a alta capacidade de produção de oxigênio singlete são as características que se desejam no FS ideal (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992; CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005; VELPULA et al., 2014; SIBATA et al., 2000).

Diversos tipos de fotossensibilizadores têm sido utilizados no TFA de fungos fitopatogênicos, incluindo-se compostos naturais produzidos por plantas, como tiofenos (DiCOSMO et al., 1982), fenileptatrienos (BOURQUE et al., 1985), fenilfenalenona (LAZZARO et al., 2004), poliacetilenos (CHRISTENSEN; BRANDT, 2005), cumarinas e furanocumarinas (De MENEZES et al., 2014a), derivados da clorofila (LUKISIENE; PASKEVICIUTE, 2011), porfirinas (VOROBAY; PINCHUK, 2008), e produtos sintéticos, como os corantes fenotiazínicos (De MENEZES et al., 2014b). O azul de metileno (MB) é o protótipo dos fenotiazínicos e está bem estabelecida sua baixa toxicidade para humanos (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006). Diversos FS derivados do MB têm sido desenvolvidos e suas características fotoquímicas e fotofísicas favoráveis os tornam potencialmente úteis para o TFA (WAINWRIGHT, 2000; WAINWRIGHT et al., 2015; WAINWRIGHT et al., 2016). O azul de metileno, o azul de toluidina (TBO) e o novo azul de metileno (NMBN) estão entre os fenotiazínicos mais utilizados no TFA (De MENEZES et al., 2014b; RODRIGUES et al., 2012). Esses FS possuem uma boa eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio e têm absorção máxima entre 625 e 660 nm (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005; DONNELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008; DUTRA, 2013). Um dos fatores que determinam a seletividade desses compostos catiônicos para as células microbianas é a interação eletrostática entre suas cargas positivas e as cargas negativas da superfície da célula de fungos e bactérias (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006).

1.3 Tratamento fotodinâmico de fungos

O tratamento fotodinâmico antimicrobiano tem se mostrado efetivo contra fungos taxonomicamente diversos, incluindo-se patógenos humanos, como *Candida* (DAI et al., 2012; GONZALES; MAISCH, 2012; RODRIGUES et al., 2013) e *Trichophyton* (RODRIGUES et al., 2012; ROMAGNOLI et al., 1998; SMIJS et al., 2004; TRIGOS; ORTEGA-REGULES, 2002), patógenos de insetos utilizados como bioinseticidas, como *Metarhizium* (GONZALES et al., 2010) e *Beauveria* (MARTIN et al., 1998); espécies saprófitas que podem atuar como patógenos oportunistas, como *Neurospora* (BLANC et al., 1976; SHIMIZU; EGASHIRA; TAKAHAMA, 1979), *Aspergillus* (DiCOSMO et al., 1982; FRIEDBERG et al., 2001; GONZALES et al., 2010), *Emericella* (TRIGOS; ORTEGA-REGULES, 2002), *Acremonium* (LUKSIENE et al., 2005), *Penicillium* (ASTHANA et al., 1993; GOMES et al., 2011), *Rhizopus* (LUKSIENE; PECIULYTE; LUGAUSKAS, 2004) e *Cryptococcus* (BOURQUE et al., 1985; RODRIGUES et al., 2012); endofíticos, como *Papulaspora* (TRIGOS; ORTEGA-REGULES, 2002); e patógenos de plantas, como *Colletotrichum* (De MENEZES et al., 2014a, b; DiCOSMO et al., 1982;), *Alternaria*, *Cladosporium*, *Rhizopus* (DiCOSMO et al., 1982; LUKSIENE; PECIULYTE; LUGAUSKAS, 2004; LUKSIENE et al., 2005; TEGEGNE et al., 2008), *Pythium*, *Saprolegnia* (DiCOSMO et al., 1982; MARES et al., 2004; TEGEGNE et al., 2008), *Fusarium* (ASTHANA et al., 1993; BOURQUE et al., 1985; KASHIWABUCHI et al., 2013; LAZZARO et al., 2004; LUKSIENE et al., 2004; LUKSIENE et al., 2005; MARES et al., 2002; MARES et al., 2004; TEGEGNE et al., 2008; VOROBAY; PINCHUK, 2008), *Trichothecium* (LUKSIENE et al., 2004), *Botrytis* (KAIRYTE et al., 2013; MARES et al., 2004; TEGEGNE et al., 2008), *Sclerotium*, *Mycosphaerella*, *Rhizoctonia*, and *Botryosphaeria* (TEGEGNE et al., 2008). Entretanto, no caso dos trabalhos com fungos fitopatogênicos, a maioria dos estudos foi realizada *in vitro*, e apenas alguns simularam condições de campo ou foram conduzidos no hospedeiro vegetal (De MENEZES et al., 2014a, b; TEGEGNE et al., 2008). Desse modo, os efeitos do TFA nas plantas hospedeiras e no meio ambiente continuam praticamente desconhecidos.

No campo, o TFA para o controle de fitopatógenos será aplicado em condições muito diferentes das condições controladas em que é utilizado na clínica. Como os fotossensibilizadores serão aplicados em quantidades muito maiores e sobre áreas extensas, é essencial que sejam pouco tóxicos e baratos. A radiação solar (em vez da radiação monocromática emitida por fontes artificiais de luz) irá ativar o fotossensibilizador aplicado nas culturas. A ampla faixa espectral e as altas irradiâncias (tanto no visível como no UV)

permitem que a radiação solar excite tanto fotossensibilizadores fenotiazínicos, que são ativados pela radiação visível, como também os diversos fotossensibilizadores produzidos por plantas, como as furanocumarinas, poliacetilenos e tiofenos, que são ativados pela radiação UV. A intensidade da radiação (irradiância) no ambiente natural varia de acordo com diversos fatores, como, por exemplo, a estação do ano, a latitude, a altitude e as condições atmosféricas (nebulosidade, poluição e humidade). Adicionalmente, os períodos de iluminação (fotoperíodos) são longos e seguem uma periodicidade diária (BRAGA et al., 2015). Em protocolos clínicos, a toxicidade seletiva do TFA pode ser aumentada tanto pela aplicação tópica do fotossensibilizador, restrita à área da lesão, como pelo controle da área que será exposta à luz. Esse tipo de protocolo, obviamente, é impraticável no campo, já que tanto a planta hospedeira como o patógeno serão tratados com o fotossensibilizador e expostos à radiação solar. Dessa forma, a seletividade do TFA no campo deve ocorrer por outras razões. O TFA também poderá ser aplicado em condições controladas na pós-colheita, tanto para a eliminação de fitopatógenos como de patógenos humanos veiculados por sementes, frutos e outros produtos agrícolas minimamente processados.

A efetividade do TFA no campo dependerá da exposição simultânea do fungo fitopatogênico à radiação solar e ao fotossensibilizador, que por sua vez, é determinada pelo ciclo de vida e ecologia dos patógenos. Os fungos fitopatogênicos podem apresentar diferenças marcantes nos seus ciclos de vida. O ciclo de vida de alguns fungos fitopatogênicos inclui o desenvolvimento de estruturas distintas e especializadas, como os esporos assexuais e sexuais, apressórios, corpos de frutificação e micélio vegetativo. Parte do ciclo de vida de algumas espécies pode ocorrer no interior da planta hospedeira, mas as estruturas reprodutivas normalmente são produzidas na superfície da planta, facilitando a dispersão de esporos assexuados e sexuados (BRAGA et al., 2015). Dessa forma, estruturas de dispersão como os conídios, que estão invariavelmente expostos à radiação, representam um dos estágios mais vulneráveis dos fungos ao TFA.

Devido à sua importância biológica, facilidade de produção, manipulação e conveniência para o uso nos protocolos experimentais, os conídios têm sido as estruturas mais utilizadas nos estudos de TFA de fungos (ARNASON et al., 1986; AVER'YANOV et al., 2011; DiCOSMO et al., 1982; De MENEZES et al., 2014a,b; GONZALES et al., 2010; KAIRYTE et al., 2013; LUKSIENE et al 2004; MARES et al., 2004; VOROBAY; PINCHUK, 2008). Os conídios desempenham um papel importante na dispersão e, em alguns casos, na persistência ambiental dos fungos. Em espécies patogênicas, os conídios também estão envolvidos no reconhecimento e na infecção do hospedeiro (BRAGA et al., 2015;

BRAGA et al., 1999; BARROS et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2010; PERES et al., 2005). As características da superfície do conídio influenciam a sua interação com as moléculas do fotossensibilizador e podem afetar o resultado do TFA (GONZALES et al., 2010). A composição química e as características biofísicas (carga eletrostática, hidrofobicidade, etc) da superfície e da parede celular dos conídios diferem muito das características das hifas vegetativas dos fungos filamentosos e das células vegetativas das leveduras. Além disso, os conídios podem variar entre estágios de desenvolvimento, história nutricional, estágio fisiológico, espécies e linhagens (GONZALES et al., 2010). O uso do TFA para matar os conídios que estão nas lesões esporuladas sobre as plantas hospedeiras ou para matar os conídios recentemente dispersos pode, potencialmente, causar uma grande redução na quantidade de propágulo do fungo presente na área da cultura afetada pela doença. A redução do inóculo normalmente é uma estratégia muito efetiva para o controle de doenças de plantas (AGRIOS, 2005; TIMER; ZITKO, 1992; ZULFIQAR; BRLANSKY; TIMMER, 1996).

O uso do TFA para matar estruturas fúngicas, como conídios de fitopatógenos, é uma aplicação recente e promissora da técnica (De MENEZES et al., 2014a, b). Embora diversos aspectos mecanísticos do TFA de fungos com os diferentes fotossensibilizadores continuem desconhecidos, trabalhos estão sendo realizados para entender como os diferentes FS interagem com as diferentes estruturas fúngicas, tanto antes, como durante o TFA, bem como para identificar as moléculas e estruturas danificadas durante o processo fotodinâmico. Entretanto, a maioria desses estudos foi conduzida com células vegetativas de *Candida* (DAI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012) e dermatófitos como *Tricophyton* (RODRIGUES et al., 2012; SMIJS et al., 2008; SMIJS; PAVEL, 2011). Pouco se sabe a respeito do mecanismo de ação e dos efeitos moleculares do TFA em estruturas fúngicas quiescentes, como conídios.

A membrana plasmática e a parede celular dos fungos são carregadas negativamente, favorecendo a ligação de FS catiônicos, como os corantes fenotiazínicos. Em fungos, a membrana plasmática é considerada o sítio primário da ação do TFA com fenotiazínicos. O azul de toluidina (TBO) liga-se instantaneamente aos polifosfatos localizado na porção externa da membrana plasmática de *Saccharomyces fragilis* (TIJSEN; BEEKES; VAN STEVENINCK, 1981). Ito e colaboradores (1977) reportaram que o TBO não penetra nas células de *Saccharomyces cerevisiae* e atribuíram a atividade fotodinâmica do composto às espécies reativas formadas no meio extracelular. O TFA levou a rápida oxidação do ergosterol e ao acúmulo de formas oxidadas do ergosterol na membrana. Os danos na membrana podem levar a subsequente penetração do fotossensibilizador ocasionando danos a estruturas internas

das células como as mitocôndrias (BÖCKING, 2000). Smijs e colaboradores (2008) relataram severas deformidades e ruptura da parede celular tanto em microconídios como no micélio de *T. rubrum*, após o TFA com o FS catiônico Sylsens B. Existem casos em que o FS penetra rapidamente na célula microbiana. Quando isso ocorre, o fotossensibilizador pode distribuir-se pelo citoplasma ou acumular-se preferencialmente em estruturas subcelulares, que, possivelmente, serão alvos iniciais do TFA (De MENEZES et al., 2014a, b). O fotossensibilizador também pode ser eliminado pela célula por meio de mecanismos ativos de transporte (DAI et al., 2012; PRATES et al., 2011;). Prates e colaboradores (2011) estudaram a influência de dois sistemas de efluxo de drogas no TFA de *Candida albicans* com o MB. Os resultados indicaram que o sistema “ATP-binding cassette” (ABC) está diretamente envolvido no efluxo do MB do citoplasma celular. A inibição do sistema ABC aumentou tanto a captação do MB como a inativação das células após o TFA. Também foi observado que tanto a captação como o efluxo do MB são regulados pelas proteínas da “major facilitator superfamily” (MFS). O bloqueio desse sistema reduziu tanto a captação do MB como a inativação das células após TFA (PRATES et al., 2011). Acredita-se que a eliminação de FS por bombas de efluxo ocorra em células metabolicamente ativas, devendo ter importância limitada em células dormentes, como os diversos tipos de conídios e esporos de fungos filamentosos. A microscopia confocal tem sido utilizada para determinar a captação e a localização intracelular de fotossensibilizadores (PRATES et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013; SO et al., 2010). Análises citométricas foram utilizadas para avaliar danos na membrana, no material genético e para avaliar o estresse oxidativo induzido pelo TFA (RIBEIRO et al., 2012; SO et al., 2010).

Os conídios são estruturas especializadas envolvidas na dispersão e, no caso de espécies patogênicas, como *Colletotrichum*, no reconhecimento e infecção do hospedeiro (BARROS et al., 2010; De MENEZES et al., 2015). Eles diferem de células metabolicamente ativas em características bioquímicas (e.g. composição química das diferentes estruturas celulares), 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 (BARROS et al., 2010; GONZALES et al., 2010). Estudos anteriores comprovam a eficácia do TFA com fenotiazínicos em conídios. Gonzales e colaboradores (2010) avaliaram o efeito do TFA com MB e TBO na sobrevivência de conídios do fungo saprófita *Aspergillus nidulans* e do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. O TFA resultou na morte de até 99,7% dos conídios, além de provocar um atraso na germinação dos conídios sobreviventes. A lavagem

dos conídios para a remoção do fotossensibilizador não ligado às células antes de expô-las à luz reduziu drasticamente a mortalidade dos conídios de *A. nidulans*, mas não dos conídios de *M. anisopliae*, indicando que os conídios das duas espécies interagem de maneira diferente com o MB e TBO.

O nosso grupo avaliou a eficácia do TFA com quatro fotossensibilizadores fenotiazínicos (MB, novo azul de metileno, TBO e um novo derivado pentacíclico do azul de metineno, denominado S137) *in vitro* em conídios de *C. acutatum* e *Colletotrichum gloesporioides* e *A. nidulans* (De MENEZES et al., 2014b). A eficácia dos tratamentos foi estabelecida inicialmente por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de cada fotossensibilizador para cada fluência (dose de luz). O S137 foi o fotossensibilizador mais eficaz por apresentar as menores CIMs para as três espécies de fungos. A melhor performance do S137 e do novo azul de metileno (NMBN) em comparação com o azul de metileno já havia sido observada em *Candida* spp. (DAI et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013) e *Trichophyton* spp. (RODRIGUES et al., 2012). Para os dois fotossensibilizadores mais eficazes (S137 e NMBN), também foi avaliado o efeito do TFA na sobrevivência dos conídios. O TFA, tanto com a luz vermelha emitida por LED, como com a radiação solar, foi muito eficaz. O TFA com NMBN (50 μM e fluência de 15 J cm^{-2} ; luz vermelha) resultou em uma redução na sobrevivência dos conídios de cinco ordens de grandeza para todas as espécies. O TFA com o S137 foi ainda mais eficaz, já que a mesma redução na sobrevivência foi obtida com 10 μM do fotossensibilizador. Estudos microscópicos mostraram que os fotossensibilizadores são incorporados pelos conídios e se acumulam em vesículas membranosas existentes no citoplasma, como os corpos lipídicos e pequenos vacúolos (De MENEZES et al., 2014b). A exposição prévia dos fotossensibilizadores NMBN e S137 à radiação solar reduziu a sua eficácia no TFA. Por exemplo, o TFA com NMBN e S137 previamente expostos à radiação solar por 3 h resultou em uma redução na sobrevivência de três ordens de grandeza em vez das cinco ordens alcançadas com os fotossensibilizadores que não foram previamente expostos. Os efeitos do TFA com os quatro fotossensibilizadores fenotiazínicos mencionados anteriormente também foram avaliados nas folhas da laranja doce ‘Valência’ (*Citrus sinensis*). Nenhum dano ocorreu nas folhas após o TFA. As análises histológicas mostraram que os fotossensibilizadores não atravessaram a espessa cutícula da folha (De MENEZES et al., 2014b).

A produção constitutiva e indutiva de metabólitos secundários fotossensibilizadores é uma das diversas estratégias que as plantas utilizam para se defender das infecções por fitopatógenos (LARSON; BERENBAUM, 1988). Fotossensibilizadores naturais produzidos

por plantas incluem poliquetídeos (polienos, tiofenos, quininas e cromenos), derivados do cinamato (cumarinas, furocumarinas), alcalóides baseados na triptamina (hermenos), na fenilalanina e tirosina (berberina e sanguinarina) ou no ácido antranílico (furanquinolinas), porfirinas (precursores e produtos de degradação da clorofila), entre outros (FLORS; NONELL, 2006; HUDSON; TOWERS, 1991).

O nosso grupo avaliou o efeito do TFA com as furanocumarinas 8-methoxipsoraleno (8-MOP) e isopimpinellina e com uma mistura 3:1 de duas cumarinas (7-methoxycumarina e citropteno) em conídios de *C. acutatum* e *A. nidulans* (De MENEZES et al., 2014a). A isopimpinellina e as duas cumarinas foram extraídas de resíduos líquidos gerados durante o processamento industrial da lima ácida Tahiti (*Citrus aurantifolia*) para a obtenção de suco. Os conídios das duas espécies foram tratados com os fotossensibilizadores e expostos à radiação solar. No escuro, os compostos tiveram um efeito mínimo na sobrevivência dos conídios. O fototratamento com 8-MOP (50 μ M) por 1 e 2 h reduziu a sobrevivência dos conídios de *C. acutatum* em 2 e 4 ordens de grandeza, respectivamente. No caso de *A. nidulans*, a redução na sobrevivência foi de aproximadamente 4 ordens de grandeza, tanto nos tratamentos com 1 h como nos tratamento por 2 h. O fototratamento com a mistura de cumarinas resultou em reduções de 1 e 3 ordens de grandeza na sobrevivência dos conídios de *C. acutatum* nos tratamentos por 1 e 2 h, respectivamente. O efeito foi ainda maior em *A. nidulans*, resultando em reduções de 4 ordens, tanto no tratamento por 1 h, como no tratamento por 2 h. O efeito do fototratamento com as furanocumarinas e cumarinas também foi avaliado nas folhas das plantas hospedeiras laranjeira, tangerina Murcott e morangueiro (*Fragaria ananassa*). O TFA com 8-MOP, com isopimpinellina e com a mistura de cumarinas não provocou nenhum dano nas folhas de citros, mas causou danos nas folhas de morangueiro. Dessa forma, é importante que seja feita uma avaliação cuidadosa dos possíveis danos na planta hospedeira em cada patossistema.

A maior parte dos fungicidas convencionais atua em alvos únicos e específicos, o que facilita o surgimento de linhagens tolerantes (DEISING; REIMANN. PASCHOLATI, 2008; PERES et al., 2010; WONG et al., 2007; WONG et al., 2008). O modo de ação do tratamento fotodinâmico, que se dá por meio da oxidação de virtualmente todos os tipos de biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e açúcares, dificulta a seleção de linhagens tolerantes e isso tem sido apontado como uma das grandes vantagens do tratamento fotodinâmico. Entretanto, deve ser ressaltado que até agora poucos estudos avaliaram sistematicamente a possibilidade de ocorrer a seleção de linhagens tolerantes ao TFA em fungos. Apesar de ainda não ter sido descrita a seleção de linhagens de fungos tolerantes ao

TFA, está bem estabelecido que a tolerância intrínseca das diferentes espécies varia muito em função de suas histórias evolutivas.

Apesar de diversas espécies de plantas produzirem potentes fotossensibilizadores, elas são infectadas por fungos e bactérias fitopatogênicos, indicando que esses patógenos especializados desenvolveram mecanismos capazes de reduzir o efeito da fotossensibilização induzida pela planta hospedeira. Diversos mecanismos envolvidos na tolerância ao TFA já foram descritos em fungos. Algumas espécies de fungos fitopatogênicos são capazes de metabolizar os fotossensibilizadores, inativando-os. Desjardins e colaboradores (1989) observaram que diversas linhagens de *Fusarium sambucinum* isoladas de plantas são capazes de metabolizar várias furanocumarinas e seus precursores. A metabolização do fotossensibilizador e sua consequente inativação, não é o único mecanismo utilizado pelos fungos para se proteger contra a fotossensibilização. Conídios de diferentes espécies acumulam diferentes pigmentos, como carotenóides e melaninas, que nem sempre estão presentes no micélio. Existem diversas evidências de que esses pigmentos protegem o conídio contra estresses, como radiação solar e estresse oxidativo, incluindo-se aquele causado por processos fotodinâmicos (BRAGA et al., 2015). Pigmentos, como carotenóides, que, devido à sua lipofilicidade normalmente estão associados às membranas, atuam inativando oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio produzidas durante o processo fotodinâmico (SHIMIZU; EGASHIRA; TAKAHAMA, 1979). Outros pigmentos como as melaninas, que são componentes estruturais da parede celular dos conídios, podem atuar filtrando os comprimentos de onda necessários para ativar os fotossensibilizadores produzidos pelas plantas (ASTHANA; TUVESON, 1992). Conídios de linhagens selvagens de diversas espécies de *Fusarium*, *Colletotrichum* e *Neurospora* são amarelados por acumularem carotenóides, enquanto conídios de *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Metarhizium* são amarronzados, azulados, acinzentados e esverdeados devido à presença de pigmentos, como a melanina, na parede celular (BRAGA et al., 2015). Asthana e Tuveson (1992) estudaram o efeito dos pigmentos de conídios na proteção de quatro espécies de patógenos de citros contra o fototratamento com os fotossensibilizadores 8-MOP e α -tertienil (α -T) produzido por plantas. Duas das espécies estudadas, *Fusarium oxysporium* e *Fusarium solani*, causam podridão na raiz e duas espécies, *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum*, causam apodrecimento dos frutos. O estudo mostrou que mutantes das duas espécies de *Fusarium* que não acumulam carotenóides são muito mais sensíveis ao TFA com α -T. A mesma comparação mostrou que os carotenóides são menos eficazes na proteção dos conídios contra o TFA com 8-MOP. Um resultado diferente foi observado em *Penicillium*. Os conídios fortemente

pigmentados de azul e verde dos conídios selvagens de *P. italicum* e *P. digitatum* são muito mais tolerantes ao TFA com 8-MOP do que as linhagens mutantes com conídios brancos. De acordo com os autores, os pigmentos azuis e verdes dos conídios poderiam atuar filtrando os comprimentos de onda necessários para a ativação do 8-MOP no interior das células (ASTHANA; TUVESON, 1992).

Existem alguns casos muito interessantes de tolerância ao tratamento fotodinâmico em fungos. Fungos fitopatogênicos pertencentes a oito diferentes gêneros produzem toxinas que são ativadas pela luz e são tóxicas para a planta hospedeira via geração de espécies reativas de oxigênio, particularmente o oxigênio singlete. *Cercospora* é o gênero mais bem estudado e tem sido utilizado como modelo em estudos que visam à compreensão da tolerância celular a fotossensibilização e às espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete, que são produzidas durante o tratamento fotodinâmico (DAUB; EHRENSHAFT, 2000).

No presente trabalho, foram estudados aspectos importantes do tratamento fotodinâmico de conídios de *C. acutatum* com fotossensibilizadores fenotiazínicos. A eficácia do TFA foi estudada pela primeira vez *in planta*, tanto sobre pétalas como sobre folhas de citros. A seleção de linhagens tolerantes foi estudada *in vitro* ao longo de mais de quarenta ciclos sucessivos de tratamento fotodinâmico em um estudo que durou mais de um ano.

6. CONCLUSÕES

- O tratamento fotodinâmico antimicrobiano com azul de metileno *in planta* foi extremamente eficaz para matar os conídios de *Colletotrichum acutatum* em todas as condições avaliadas;
- O TFA com MB danifica a membrana plasmática e induz a formação de espécies reativas de oxigênio tardias nos conídios de *C. acutatum*;
- A aplicação do azul de metileno não causou nenhum dano visível nas folhas e nas flores da planta hospedeira *Citrus sinensis*;
- É possível selecionar linhagens de *C. acutatum* mais tolerantes ao TFA com novo azul de metileno ao longo de sucessivos ciclos de TFA e de seleção de sobreviventes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5ª ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, 922p, 2005.

ALMEIDA, J. G. F. Barreiras às exportações de frutas tropicais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 7-10, 2002.

ALMEIDA, L. C. C.; COÊLHO, R. S. B. Caracterização da agressividade de isolados de *Colletotrichum* de maracujá amarelo com marcadores bioquímico, fisiológico e molecular. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 318-328, 2007.

ARNASON, J. T.; BOURQUE, G. J.; MADHOSINGH, C.; ORR, W. Disruption of membrane functions in *Fusarium culmorum* by an acetylenic allelochemical. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, p. 569-574, 1986.

ASTHANA, A.; MCCLOUD, E. S.; BERENBAUM, M. R.; TUVESON, R. W. Phototoxicity of *Citrus jambhiri* to fungi under enhanced UV-B radiation: role of furanocoumarins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, p. 2813-2829, 1993.

ASTHANA, A.; TUVESON, R. W. Effects of UV and phototoxins on selected fungal pathogens of citrus. **International Journal of Plant Science**, v. 153, p. 442-452, 1992.

AVER'YANOV, A. A. et al. Suppression of cucurbit scab on cucumber leaves by photodynamic dyes. **Crop Protection**, v. 30, p. 925-930, 2011.

AZEVEDO, C. P.; CAFÉ FILHO, A. C.; HENZ, G. P.; REIS, A. Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas. **Brasília: Embrapa hortaliças**, 4 p., 2006.

AZEVEDO, F. A. et al. Floração e frutificação de laranjeira Valência enxertada em tangerineira Cleópatra e limoeiro Cravo. **Citrus Research & Technology**, v. 33, n. 2, p. 59-64, 2012.

BALTAZAR, L. M. et al. Antimicrobial phodynamic therapy: na effective alternative approach to control fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 202-2015

BARROS, H. R. B. et al. 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.

BARROS, G. S. C. et al. **Relatório PIB Agro** Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/comunicacao/Cepea_PIB_BR_jul13.pdf>. Acesso em: 28 de março, 2016.

BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. **Oxford: British Society for Plant Pathology**, p 388, 1992.

BASIJI, D. A. et al. Cellular image analysis and imaging by flow cytometry. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 27, p. 653-670, 2007.

BERNAL, C. et al. Selective Photoinactivation of *C. albicans* and *C. dubliniensis* with hypericin. **Laser Physics**, v. 21, n. 1, p. 245-249, 2011.

BILSKI, P. et al. Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, n. 2, p. 129-134, 2000.

BLANC, P. L.; TUVESON, R. W.; SARGENT, M. L. Inactivation of carotenoid-producing and albino strains of *Neurospora crassa* by visible light, blacklight, and ultraviolet radiation, **Journal of Bacteriology**, v. 125, n. 2, p. 616-625, 1976.

BOARETTO, A. E.; MURAOKA, T.; BOARETTO, R. M. Absorção e translocação de micronutrientes, aplicados via foliar, pelos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 21, n. 1, p. 177-197, 2003.

BÖCKING, T. Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v. 27, p. 1607-1618, 2000.

BOURQUE, G.; ARNASON, J. T.; MADHOSINGH, C.; ORR, W. The photosensitization of the plant pathogen *Fusarium culmorum* by phenylheptatriyne from *Bidens pilosa*. **Canadian Journal of Botany**, v. 63, p. 899-902, 1985.

BRADNER, J. R.; NEVALAINEN, K. M. H. Metabolic activity in filamentous fungi can be analysed by flow cytometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, p. 193-201, 2003.

BRAGA, G. U. L. et al. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. **Current Genetics**, v. 61, p. 405-425, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. AGROFIT. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 4 Julho, 2011.

CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. A. Comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 78, p. 1-6, 2005.

CASAS A, et al. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 2486-2515, 2011.

CHRISTENSEN, L. P.; BRANDT, K. Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 683-693, 2005.

CONN, P. F.; SCHALCH, W.; T.; TRUSCOTT, T. G. The singlet oxygen and carotenoid interaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 11, p. 41-47, 1991.

DAI, T.; BIL De ARCE, V. J.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 5710-5717, 2011.

- DAI, T. et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as na alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-16, 2012.
- DAUB, M. E. Peroxidation of tobacco membrane lipids by the photosensitizing toxin, cercosporin. **Plant Physiology**, v. 69, p. 1361-1364, 1982.
- DAUB M.; E, BRIGGS, S. P. Changes in tobacco cell-membrane composition and structure caused by the fungal toxin, cercosporin. **Plant Physiology**, p. 763-766, 1983.
- DAVIES, M. J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, p. 761-770, 2003.
- DAVIES, M. J. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. **Journal of Photochemistry and Photobiology Sciences**, v. 3, p. 17-25, 2004.
- DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 286-295, 2008.
- De MENEZES, H. D. et al. Growth under visible light increases conidia and mucilage production and tolerance to UV-B radiation in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 2, p. 397-402, 2015.
- De MENEZES, H. D. et al. 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. et al. *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.
- DEMIDOVA, 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.
- Desjardins, A. E.; Spencer, G. F.; Plattner, R. D. Tolerance and metabolism of furanocoumarins by the phytopathogenic fungus *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*). **Photochemistry**, v. 28, p. 2963-2969, 1989.
- De SOUZA, S. C. et al. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 83, p. 34-38, 2006.
- DiCOSMO, F.; TOWERS, G. H. N.; LAM, J. Photo-induced fungicidal activity elicited by naturally occurring thiophene derivatives. **Pesticide Science**, v. 13, p. 589-594, 1982.
- DONNELLY, R. F.; McCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal Photodynamic Therapy. **Microbiological Research**, v. 163, p. 1-12, 2008.
- DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 58, p. 895-900, 1993.

DUTRA, D. A. M. **Avaliação do fotossensibilizador azul de metileno em diferentes formulações para uso em terapia fotodinâmica**. Santa Maria. Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências da Saúde. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em ciências odontológicas, 2013.

EHRENSHAFT M, et al. SOR1, a gene required for photosensitizer and singlet oxygen resistance in *Cercospora* fungi, is highly conserved in divergent organisms. **Molecular Cell**, v. 1, p. 603-609, 1998.

EICHNER, A. et al. Fast and effective inactivation of *Bacillus atrophaeus* endospores using light-activated derivatives of vitamin B2. **Photochemical and Photobiology Sciences**, v. 14, p. 387-396, 2015.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 3ª ed. São Paulo SP. Agronômica Ceres, p. 261-296, 1997.

FEKRAZAD, R.; BARGHI, V. G. B.; MIR, A. P. B.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M. *In vitro* photodynamic inactivation of *Candida albicans* by phenothiazine dye (new methylene blue) and Indocyanine green (EmunDo®). **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, p. 52-57, 2015.

FERNANDES, M. C. A.; SANTOS, A. S.; RIBEIRO, R. L. D. Adaptação patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de jiloeiro, pimentão e berinjela. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 4, p. 325-330, 2002.

FLORS, C.; NONELL, S. Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxic phenalenone phytoalexins. **Accounts of Chemical Research**, v. 33 p. 293-300, 2006.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

FRIEDBERG, J. S. et al. *In vitro* effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 105-107, 2001.

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.

FUNDECITRUS. **Podridão Floral**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/podridao-floral/13>>. Acesso em: 29 mai. 2015.

GIROTTI, A. W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, p. 103-113, 2001.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 78, 2000.

GOMES, M. C. et al. Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins. **Photochemical and Photobiology Sciences**, v. 10, p. 1735-1743, 2011.

GONZALES, F. P.; MAISCH, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. **Fungal Biology**, v. 116, p. 1-10, 2012.

GONZALES, F. P.; SILVA, S. H.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. L. Photodynamic Inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 653-661, 2010.

GIULIANI, F. et al. *In Vitro* resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II)phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 637-642, 2010.

HAO, B.; CHENG, S.; CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 326-332, 2013.

HARRIS, F.; CHATFIELD, L. K.; PHOENIX, D. A. Phenothiazinium based photosensitizers-photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 615-627, 2006.

HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does Photodynamic therapy work? **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, p. 145-157, 1992.

HOCKBERGER, P. E. A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v.76, p. 561-579, 2002.

HUANG, L.; DAI, T.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. **Methods in Molecular Biology**, v. 635, p. 155-173, 2010.

HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Therapeutic potential of plant photosensitizers. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 49, p. 181-222, 1991.

Instituto brasileiro de geografia e estatística (IBGE). **PIB agropecuário foi prejudicado por cana, café e laranja.** Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2015/12/pib-agropecuario-foi-prejudicado-por-cana-cafe-e-laranja-diz-ibge.html>>. Acesso em: 28 de março, 2016.

ITO, T. Toluidine blue: the mode of photodynamic action in yeast cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 25, n. 1, p. 47-53, 1977.

JENNS, A. E.; DAUB, M. E. Characterization of mutants of *Cercospora nicotianae* sensitive to the toxin cercosporin. **Phytopathology**, v. 85, p. 906-912, 1995.

JENNS, A. E.; DAUB, M. E.; UPCHURCH, R. G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. **Phytopathology**, v. 79, p. 213-219, 1989.

JUZENAS, P.; MOAN, J. Singlet oxygen in photosensitization. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, v. 25, n. 1-2, p. 29-50, 2006.

KAIRYTE, K.; KADYS, A.; LUKSIENE, Z. Antibacterial and antifungal activity of photoactivated ZnO. **Journal of Photochemical and Photobiology B: Biology**, v. 128, p. 78-84, 2013.

KASHIWABUCHI, R. T. Assessment of fungal viability after long-wave ultraviolet light irradiation combined with riboflavin administration. **Graefes Archives for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 251, p. 521-527, 2013.

KIM, S. Y.; KWON, O. J.; PARK, J. W. Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye. **Biochimie**, v. 83, p. 437-444, 2001.

KÖMERIK, N.; MACROBERT, A. J. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, v. 25, n. 1-2, p. 487-504, 2006.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; De GOES, A. Controle Biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 251-257, 2003.

KWON, W. I.; EPSTEIN, L. A 90-kDa glycoprotein associated with adhesion of flectria haematococcamacroconidia to substrata. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, p. 481-487, 1993.

LACOMBE, S. et al. Solvent-free production of singlet oxygen at the gas–solid interface: visible light activated organic-inorganic hybrid microreactors including new cyanoaromatic photosensitizers. **Langmuir**, v. 25, p. 11168-11179, 2009.

LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C. G.; VAN MARLE, J. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 2026-2034, 2005.

LANDUM, M. C. et al. Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. **Microbiological Research**, v. 183, p. 100-108, 2016.

LANG, K.; MOSINGER, J.; WAGNEROVA, D. M. Progress in photochemistry of singlet oxygen. **Chemistry Listy**, v. 99, p. 211-221, 2005.

LARSON, R. A.; BERENBAUM, M. R. Environmental phototoxicity. **Environmental Science and Technology**, v. 22, p. 354-360, 1988.

LAURO, F. M. et al. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene–polylysine conjugates. **Photochemistry and Photobiology Science**, v. 1, p. 468-470, 2002.

LAZZARO, A. et al. Light- and singlet oxygen-mediated antifungal activity of phenylphenaleone phytoalexins. **Photochemical and Photobiology Sciences**, v. 3, p. 706-710, 2004.

LEANDRO, L. F. S. et al. Germination and Sporulation of *Colletotrichum acutatum* on Symptomless Strawberry Leaves, **The American Phytopathological Society**, v. 91, n. 7, p. 659-664, 2001.

LIMA FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum spp.* associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 620-625, 2003.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 672, 2006.

LUKSIENE, Z.; BUCHOVEC, I.; PASKEVICIUTE, E. Inactivation of food pathogen *Bacillus cereus* by photosensitization *in vitro* and on the surface of packing material. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 2037-2046, 2009.

LUKSIENE, Z.; BUCHOVEC, E.; PASKEVICIUTE, I. Inactivation of *Bacillus cereus* by Na-chlorophyllin-based photosensitization on the surface of packing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1540-1548, 2010a.

LUKSIENE, Z.; BUCHOVEC, I.; PASKEVICIUTE, E. Inactivation of several strains of *Listeria monocytogenes* attached to the surface of packing material by Na-Chlorophyllin-based photosensitization. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 101, p. 326-331, 2010b.

LUKSIENE, Z. et al. Towards environmentally and human friendly insect pest control technologies: photosensitization of leafminer flies *Liriomyza bryoniae*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 89, p. 15-21, 2007.

LUKSIENE, Z.; PASKEVICIUTE, E. Novel approach to the microbial decontamination of strawberries: chlorophyllin-based photosensitization. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 1274-1283, 2011.

LUKSIENE, Z.; PECIULYTE, D.; JURKONIENE, S.; PURAS, R. Inactivation of possible fungal food contaminants by photosensitization. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 43, p. 335-341, 2005.

LUKSIENE, Z.; PECIULYTE, D.; LUGAUSKAS, A. Inactivation of fungi *in vitro* by photosensibilization: preliminary results. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 11, p. 215-220, 2004.

LUQUE, E. M. et al. A Relationship between carotenoid accumulation and the distribution of species of the fungus *Neurospora* in Spain. **PLOS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

MACIEL, C. M. et al. Methylene blue-mediated photodynamic inactivation followed by low-laser therapy versus miconazole gel in the treatment of denture stomatitis. **Journal of Prosthodontics**, v. 25, p. 28-32, 2016.

MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 14, n. 8, p. 1518-1526, 2015.

MAISCH, T.; SZEIMIES, R.; JORI, G.; ABELS, C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. **Photochemistry and Photobiology Sciences**, v. 3, p. 907-917, 2004.

MANOIL, D. et al. Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, p. 372-379, 2014.

MARES, D. et al. Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. **Microbiological Research**, v. 159, p. 295-304, 2004.

MARES, D.; TOSI, B.; ROMAGNOLI, C.; POLI, F. Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, p. 400-404, 2002.

MARTIN, P. A. W.; MISCHKE, S.; SCHRODER, R. F. W. Compatibility of photoactive dyes with insect biocontrol agents. **Biocontrol Science and Technology**, v. 8, p. 501-508, 1998.

MASCIO, P.; RAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 274, n. 2, p. 532-538, 1989.

MELO, W. C. M. A.; PERUSSI, J. R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, 2012.

MERCURE, E. W.; LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Adhesion of ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 45, p. 421-440, 1994.

MONTGOMERY, D. C. **Design an analysis of experiments**. 5ª ed. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Song. p. 557, 2001.

NASCIMENTO, E. et al. Quantification of cyclobutane pyrimidine dimers induced by UVB radiation in conidia of the fungi *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Metarhizium acridum* and *Metarhizium robertsii*. **Photochemical and Photobiology**, v. 86, p. 1259-1266, 2010.

NEVES, M. F. et al. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. 1ª ed. Ribeirão Preto, v. 1, p. 137, 2010.

NICHOLSON, R. L.; EPSTEIN, L. Adhesion of fungi to the plant surface: Prerequisite for pathogenesis. **The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals**, p. 3-23, 1991.

OUÉDRAOGO, G. D.; REDMOND, R. W. Secondary reactive oxygen species extend the range of photosensitization effects in cells: DNA damage produced via initial membrane photosensitization. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 2, p. 192-203, 2003.

PENDIGO, L. A. Absence of Bacterial Resistance Following Repeat Exposure to Photodynamic Therapy. **Photodynamic Therapy: Back to the Future**, v. 7380, doi: 10.1117/12.822834, 2009.

PERES, N. A.; SEIJO, T. E.; TURECHEK, W. W. Pre- and post-inoculation activity of a protectant and a systemic fungicide for control of anthracnose fruit rot of anthracnose fruit rot of strawberry under different wetness durations. **Crop Protection**, v. 29, p. 1105-1110, 2010.

PERES, N. A.; TIMMER, L. W.; ADASKAVEG, J. E.; CORRELL, J. C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, v. 89, n. 8, p. 784-796, 2005.

PINA-VAZ, C.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RODRIGUES, A. G.; ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of two probes for testing susceptibilities of pathogenic yeasts to voriconazole, itraconazole, and caspofungin by flow cytometric. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4674-4679, 2005.

PRATES, R. A. et al. Effect of virulence factors on the photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, 2013

PRATES, R. A. et al. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 7, p. 1525-1532, 2011.

RIBEIRO, A. P. D. et al. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and biofilms of *Candida albicans* mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, p. 111-119, 2013.

RISTIC, B. Z. et al. Photodynamic antibacterial effect of graphene quantum dots. **Biomaterials**, v. 35, p. 4428-4435, 2014.

ROBERTO, S. R.; BORGES, A. V. Efeito do estágio de desenvolvimento das flores e da aplicação de fungicidas no controle da Podridão Floral dos Citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 306-309, 2001.

RODRIGUES, G. B., et al. *In vitro* photodynamic inactivation of *Candida* species and mouse fibroblasts with phenothiazinium photosensitizers and red light. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, p. 141-149, 2013.

RODRIGUES, G. B.; FERREIRA, L. K. S.; WAINWRIGHT, M.; BRAGA, G. U. L. Susceptibilities of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 116, p. 89-94, 2012.

RODRIGUES, J. C. V., CHILDRES, C. C. **LARANJA**, Cordeirópolis, v.23, n.1, p.77-100, 2002.

ROLIM, G. S. et al. Classificação climática de köppen e de thornthwaite e sua aplicabilidade na determinação de zonas agroclimáticas para o estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 66, n. 4, p. 711-720, 2007

ROMAGNOLI, C.; MARES, D.; SACCHETTI, G.; BRUNI, A. The photodynamic effect of 5-(4-hydroxy-1-butynyl)-2,2'-bithienyl on dermatophytes. **Mycological Research**, v. 102, p. 1519-1524, 1998.

ROSA, L. P. et al. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy using a 660 nm laser and methylene blue dye for inactivating *Staphylococcus aureus* biofilms in compact and cancellous bones: An *in vitro* study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, p. 276-281, 2015.

SANCHES, F. R. **Aplicação de biorreguladores vegetais: aspectos fisiológicos e aplicações práticas na citricultura mundial**. 1ª edição. Jaboticabal: Funep, 160 p., 2000.

SHACKLEY, D. C. et al. Comparison of the cellular molecular stress responses after treatments used in bladder cancer. **BJU International**, v. 90, p. 924-932, 2002.

SCHEFFER, R.P. Role of toxins in evolution and ecology of plant pathogenic fungi. **Experientia**, v. 47, p. 804-811, 1991.

SHIMIZU, M.; EGASHIRA, T.; TAKAHAMA, U. Inactivation of *Neurospora crassa* conidia by singlet molecular oxygen generated by a photosensitized reaction. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 2. p. 293-296, 1979.

SIBATA, C. H.; COLUSSI, V. C.; OLEINICK, N. L.; KINSELLA, T. T. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 869-880, 2000.

SILVA, E. B. F.; BARBOSA, I. J. F.; BARRETO, H. M.; SIQUEIRA Jr, J. P. Modulation of the UVB-induced lethality by furocoumarins in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 130, p. 260-263, 2014.

SILVA Jr, G. J. S. **Podridão floral dos citros: dinâmicas temporal e espacial, sensibilidade de *Colletotrichum acutatum* a fungicidas e controle da doença**. Tese apresentada para título de Doutor em ciências. Área de concentração: Fitopatologia. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

SILVA, K. S. et al. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n 1, p. 131-133, 2006.

SKOVSEN, E.; SNYDER, J. W.; LAMBERT, J. D. C.; OGILBY, P. R. Lifetime and Diffusion of Singlet Oxygen in a Cell. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 8570-8573, 2005

SMIJS, T. G. M.; 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 therapy**, v. 60, p.750-759, 2007.

SMIJS, T. G. M. et al. Photodynamic treatment of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its microconidia with porphyrin photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, p. 197-202, 2004.

SMIJS, T. G. M. et al. Morphological changes of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* after photodynamic treatment: a scanning electron microscopy study. **Medical mycology**, v. 46, p. 315-325, 2008.

SMIJS, T. G. M.; PAVEL, S. The susceptibility of dermatophytes to photodynamic treatment with special focus on *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 2-13, 2011.

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.; SCHUITMAKER, H. J. Photodynamic Inactivation of the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 3, p. 556-560, 2003.

SMOLINSKA, M. et al. The hybrid methylene blue–zeolite system: a higher efficient photocatalyst for photoinactivation of pathogenic microorganisms. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, p. 61-72, 2015.

SO, C. W. et al. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* by BAM-SiPc. *Mycoses Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*, v. 53, p. 215-220, 2010.

SOUKOS, N. S. et al. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 2595-2601, 1998.

SPÓSITO, M. B. et al. **Doenças fúngicas em citros**. Cultivar Hortalças e Frutas, 2006.

St. DENIS, T. G. et al. All you need is light: Antimicrobial photoinactivation as a novel and emerging discovery strategy against infectious disease. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 509-520, 2011.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. **The citrus industry**, v. 1, p. 190-430, 1967.

TEGEGNE, G.; PRETORIUS, J. C.; SWART, W. J. Antifungal properties of *Agave africanus* L. extracts against plant pathogens. **Crop Protection**, v. 27, p. 1052-1060, 2008.

TEGOS, G. P. et al. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3202-3209, 2008.

TIJSSEN, 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.

TIMMER, L. W.; AGOSTINI, J. P.; ZITKO, S. E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, v. 78, n. 4, p. 329-334, 1994.

TIMMER, L. W., PERES, N. A. 2015 Where have all the flowers gone? Postbloom fruit drop of citrus in the Americas. **Journal of Citrus Pathology**, v. 2, n. 1, 2015.

TIMMER, L. W; ZITKO, S. E. Timing of fungicide applications for control of postbloom fruit drop of citrus in Florida. **Plant Disease**, v. 76, p. 820-823, 1992.

TRIGOS, Á.; ORTEGA-REGULES, A. Selective destruction of microscopic fungi through photo-oxidation of ergosterol. **Mycologia**, v. 94, p. 563-568, 2002.

UPCHURCH, R. G. et al. Mutants of *Cercospora kikuchii* altered in cercosporin synthesis and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2940-2945, 1991.

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, n. 2, p. 165-173, 2001.

VANDRESEN, C. C. V. et al. In vitro photodynamic inactivation of conidia of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum graminicola* with cationic porphyrins. Photochemical and Photobiological Sciences, doi: 10.1039/C5PP00372E, 2016.

VATANSEVER, F. et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 37, p. 955-989, 2013.

VELPULA, N. et al. Photodynamic therapy: A new modality treatment in pre-cancer and cancer patients. **International Journal of Case Reports and Images**, v. 5, n. 4, p. 250-257, 2014.

VERA, D. M. A. et al. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 499-511, 2012.

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. Methylene blue derivatives-suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p. 381-394, 2000.

WAINWRIGHT, M.; SMALLEY, H.; SCULLY, O.; LOTFIPOUR, E. Comparative photodynamic evaluation of new phenothiazinium derivatives against *Propionibacterium acnes*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 523-526, 2012.

WAINWRIGHT, M, et al. Phenothiazinium photoantimicrobials with basic side chains. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 150, p. 38-43, 2015.

WHARTON, P. S.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 61, n. 1, p. 3-22, 2004.

WONG, F. P.; DE LA CERDA, K. A.; HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; MIDLAND, S. L. Detection and characterization of benzimidazole resistance in California populations of *Colletotrichum cereal*. **Plant Disease**, v. 92, p. 239-246, 2008.

WONG, F. P.; MIDLAND, S. L. Sensitivity distributions of California populations of *Colletotrichum cereale* to the DMI fungicides propiconazole, myclobutanil, tebuconazole, and triadimefon. **Plant Disease**, v. 91, p. 1547-1555, 2007.

WRIGHT, A.; HAWKINS, C. L.; DAVIES M. J. Photo-oxidation of cells generates long-lived intracellular protein peroxides. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 6, p. 637-647, 2003.

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R. H.; TIMMER, L. W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycological Society of America**, v. 88, n. 1, p. 121-128, 1996.