UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

# Inativação fotodinâmica de conídios dos fungos *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e cumarínicos

Henrique Dantas de Menezes

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

# Inativação fotodinâmica de conídios dos fungos *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e cumarínicos

*Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociencias Aplicadas à Farmácia no dia 29/08/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.

Dissertação de Mestrado apresentado 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

Orientado: Henrique Dantas Menezes
Orientador: Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga

Ribeirão Preto

2012

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.

Menezes, Henrique Dantas
Inativação fotodinâmica de conídios dos fungos *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e cumarínicos
125 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia
Orientador: Braga, Gilberto Úbida Leite

1. Inativação fotodinâmica de fungos. 2. Fotossensibilizadores fenotiazínicos. 3. Fotossensibilizadores cumarínicos. 4. *Aspergillus nidulans*. 5. *Colletotrichum gloeosporioides*. 6. *Colletotrichum acutatum.*

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Nome do aluno: Henrique Dantas de Menezes
Título do trabalho: Inativação fotodinâmica de conídios dos fungos *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e cumarínicos

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

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Geraldo e Eleusa pelo amor, carinho e orientação. Fundamentais em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão Renato pela amizade.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga obrigado por me receber em seu laboratório e pelas críticas construtivas que ajudaram na minha evolução;

A aluna de doutorado Gabriela Braga Rodrigues do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP pelo auxílio na realização dos experimentos de inativação fotodinâmica de fungos e na organização dos resultados;

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos e a Dra. Ana Carolina Pereira do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP pelo auxílio nas extrações e identificações das cumarinas e furanocumarina e pelo auxílio na redação desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Luciano Bachmann do Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto- USP pelo auxilio na dosimetria das fontes de luz, naturais e artificiais, utilizadas nesse trabalho;

A Profa Dra. Simone de Pádua Teixeira do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP pelo auxilio nos experimentos de histologia vegetal;

Ao Dr. Carlos Artério Sorgi do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP pela colaboração nas análises microscópicas dos conídios do fungo *Colletotrichum acutatum*;

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da USP (ESALQ-USP) por ter fornecido linhagens de *Colletotrichum* utilizadas nesse trabalho;

Ao pesquisador Dr. Geraldo José Silva Júnior do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus, Araraquara, SP) por ter fornecido linhagens de *Colletotrichum* utilizadas nesse trabalho;

Ao Helton Carlos de Leão, da empresa Citrosuco, pelo fornecimento dos produtos e sub-produtos do processamento do Limão Tahiti;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira e aos meus amigos Erick, Bruno, Lucas e Renata do Laboratório de Bioquímica e Fotoquímica do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (LABIOFOT - IQ UFU) por nos fornecer o equipamento LED600 utilizado nesse trabalho;

Ao técnico José Orestes Del Ciampo do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Farmácia Homeopática do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP pelas medidas de potencial zeta;

Aos técnicos Ludmilla Tonani, Maria Laura de P. L. Pereira e Fernando Grine Martins pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus amigos Juliana Campos Pereira, Renata Reis, Thayse T. Mota, Guilherme Brancini, Marina Batistuti e David Tatsuo Atique Sawazaki por todos os momentos de trabalho e alegria vividos durante esses dois anos;

A minha namorada Sandra pela paciência e pela valiosa contribuição na confecção desse trabalho;

A Deus por sempre iluminar meu caminho;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (Processo 2010/01712-6).

# RESUMO

Menezes, H. D. **Inativação fotodinâmica de conídios dos fungos *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e cumarínicos.** 2012. 125f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O tratamento fotodinâmico antifúngico (APDT) é um método promissor que combina um fotossensibilizador não tóxico (FS), oxigênio e luz visível para provocar a morte seletiva das células microbianas. O desenvolvimento do APDT depende da identificação de FS que sejam eficazes para as diferentes espécies de patógenos. No presente estudo, as suscetibilidades, *in vitro*, de conídios de *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* (ambas são espécies fitopatogênicas) e *Aspergillus nidulans* ao APDT com quatro FS fenotiazínicos [azul de metileno (MB), novo azul de metileno N (NMBN), azul de toluidina O (TBO) e o novo fenotiazínico pentacíclico S137 (S137)] em combinação com a luz vermelha, foram investigadas. Nós também avaliamos a suscetibilidade dos conídios de *C. acutatum* e *A. nidulans* ao APDT com o psoraleno 8-metóxipsoraleno (8-MOP), com duas cumarinas (7-metoxicumarina e 5,7-dimetóxicumarina) e com uma furanocumarina (isopimpinelina) em combinação com a radiação solar. Ambas as cumarinas e a furanocumarinas foram extraídas, no presente trabalho, do limão Tahiti (*Citrus latifolia*). Os efeitos dos tratamentos com os diferentes FS nas folhas de laranja-pera (*Citrus sinensis*) também foram avaliados. O NMBN e o S137 foram os fenotiazínicos mais eficazes. Os APDT com o NMBN (50 µM) e S137 (10 µM) e dose de luz de 25 J $cm^{-2}$ resultaram na redução de aproximadamente 5 logs na sobrevivência dos conídios das três espécies. O APDT com o 8-MOP e com as cumarinas resultaram em uma redução de aproximadamente 4 logs na sobrevivência dos conídios de *C. acutatum* e *A. nidulans*. O APDT com a furanocumarina foi menos efetivo e resultou em uma redução na sobrevivência dos conídios de aproximadamente dois logs para *C. acutatum* e de três logs para *A. nidulans*. Nenhum dano nas folhas foi observado quando os FS foram colocados na superfície adaxial das folhas. Os estudos histológicos mostraram que nenhum dos FS fenotiazínicos atravessou a cutícula das folhas.

Palavras-chave: Tratamento fotodinâmico antifúngico, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus nidulans*, Fotobiologia de fungos

## ABSTRACT

Menezes, H. D. **Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Aspergillus nidulans, Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with phenothiazinium and coumarinium photosensitizers.** 2012. 125f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Antifungal photodynamic treatment (APDT) is a promising method that combines a nontoxic photosensitizer (PS), oxygen and visible light to cause selective killing of microbial cells. The development of APDT depends on identifying effective PS for the different pathogenic species. In the present study, the *in vitro* susceptibilities of *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* (both are phytophatogenic species) and *Aspergillus nidulans* conidia to APDT with four phenothiazinium PS [methylene blue (MB), new methylene blue N (NMBN), toluidine blue O (TBO) and the novel pentacicyclic phenothiazinium S137 (S137)] in combination with red light were investigated. We also evaluated the susceptibilities of *C. acutatum* and *A. nidulans* conidia to APDT with the psoralen 8-methoxypsoralen (8-MOP), with two coumarins (7-methoxicoumarin and 5,7-dimethoxycoumarin) and one furanocoumarin (isopimpinelin) in combination with solar radiation. Both the coumarins and the furanocoumarin were extracted, in the present work, from Tahiti lemon (*Citrus latifolia*). The effects of the treatments with all the PS on *Citrus sinensis* leaves were also evaluated. NMBN and S137 were the more effective phenothiazinium PS. APDT with NMBN (50 µM) and S137 (10 µM) and light dose of 25 J $cm^{-2}$ resulted in a reduction of approximately 5 logs in the survival of the conidia of the three species. APDT with 8-MOP and with the coumarins resulted in a reduction of approximately 4 logs in the survival of *C. acutatum* and *A. nidulans* conidia. APDT with the furanocumarin was less effective and resulted in the reduction of approximately 2 logs for *C. acutatum* and 3 logs for *A. nidulans*. No damages to the leaves were observed when the PS were spotted on the adaxial surface of the leaves and the plants were exposed to solar radiation. Histological studies showed that the phenothiazinium PS did not cross the leave cuticle.

Keywords: Antifungal photodynamic treatment, *Colletotrichum acutatum, C. gloeosporioides, Aspergillus nidulans, Fungal photobiology*.

# RESUMEN

Menezes, H. D. **Inactivación fotodinámica de conidios de los hongo *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* con fotosensibilizadores fenotiazínicos y cumarínicos.** 2012. 125f. Disertación (Maestría). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de San Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

El tratamiento fotodinámico antifúngico (APDT) es un método prometedor que combina un fotosensibilizador no tóxico (FS), el oxígeno y la luz visible para causar la muerte selectiva de las células microbianas. El desarrollo de APDT depende de la identificación de FS que sean efectivos para las diferentes especies de patógenos. En este estudio, la susceptibilidad, *in vitro*, de conidios de *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* (ambos especies fitopatógenas) y *Aspergillus nidulans* al APDT con cuatro FS fenotiazina [azul de metileno (MB), nuevo azul de metileno N (NMBN) azul de toluidina O (TBO) fenotiazina y el nuevo pentacíclico S137 (S137)] en combinación con luz roja, se investigaron. También se evaluó la susceptibilidad de los conidios de *C. acutatum* y *A. nidulans* al APDT con psoraleno 8-metoxipsoraleno (8-MOP), con dos cumarinas (7-metoxicumarina y 5,7-dimethoxycoumarin) y una furanocumarina (isopimpinelina) en combinación con la radiación. Ambas cumarinas y furocumarinas fueron extraídas en este presente trabajo, lima Tahití (Citrus latifolia).Los efectos de los tratamientos con los diferentes FS en las hojas de la naranja pera (*Citrus sinensis*) también fueron evaluados. El NMBN y S137 fueron los fenotiazínicos más eficaces. Los APDT como el NMBN (50 µM) y S137 (10 µM) y dosis de luz de 25 J $cm^{-2}$ resultaron en la reducción de aproximadamente el 5 logs en la sobrevivencia de los conidios de las tres especies. El APDT con el 8-MOP y con las cumarinas resultaron en una reducción de aproximadamente 4 logs en la sobrevivencia de los conidios de *C. acutatum* y *A. nidulans*. La APDT con la furanocumarina fue menos eficaz y resultó en una reducción en la sobrevivencia de aproximadamente dos y tres logs para *C. acutatum* y *A. nidulans*, respectivamente. Ningún daño en las hojas se observó cuando los FS se adicionaron sobre la superficie adaxial de las hojas. Los estudios histológicos mostraron que ninguno de los fenotiazínicos FS traspaso la cutícula de las hojas.

Palabras-claves: Tratamiento fotodinámico antifúngico, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus nidulans*, Fotobiología de hongos

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 –** Estrutura química dos FS fenotiazínicos (A) azul de metileno e (B) azul de toluidina.....7

**Figura 2 –** Estrutura típica de uma cumarina (A) e de um psoraleno (furanocumarina) (B).....8

**Figura 3 –** Estrutura química dos FS fenotiazínicos usados no estudo.....17

**Figura 4 –** Estrutura química dos FS furanocumarínicos e cumarínicos (A) 8-MOP, (B1) 7-metoxicumarina, (B2) 5,7-dimetoxicumarina e (C) isopimpinelina.....18

**Figura 5 –** Espectro de absorção no visível dos FS fenotiazínicos MB, TBO, NMBN e S137. Os espectros foram obtidos na concentração 10 µM.....18

**Figura 6 –** Espectro de absorção no ultravioleta do 8-MOP da fração 1 (7-metoxicumarina e 5,7-dimetoxicumarina) e da fração 2 (isopimpinelina). Os espectros foram obtidos na concentração 10 µM (8-MOP e isopimpinelina) e 1,25 mg $L^{-1}$ (fração 1).....19

**Figura 7 –** Emissão espectral do (A) LED brancos, (B) LED600 e (C) das lâmpadas fluorescentes UVA.....20

**Figura 8 –** Inativação fotodinâmica de conídios de (A e B) *C. acutatum*, (C e D) *C. gloeosporioides* e (E e F) *A. nidulans* com NMBN e S137. Os conídios foram incubados com o FS e, a seguir, lavados ou não para a retirada do FS não ligado, antes de serem expostos às diferentes doses de luz. Cada valor é a média de três experimentos independentes e a barra indica o desvio padrão da média.....45

**Figura 9 –** Tratamento dos conídios de *C. acutatum* com o FS NMBN (10, 50 e 100 µM) e com os corante Sudan III (0,5 %), FM®4-64 (8 µM) e DAPI (3,5 mM). (A) conídio não tratado com os FS e nem com o corante; (B) conídio tratado com Sudan III, (C) conídio tratado com FM®4-64, (D) conídio tratado com DAPI, (E) conídio tratado com o NMBN (10 µM) e não lavado, (F) conídio tratado com o NMBN (10 µM) e, a seguir, lavado para a retirada do excesso de FS, (G) conídio tratado com o NMBN (50 µM) e não lavado, (H) conídio tratado com NMBN (50 µM) e lavado, (I) conídio tratado com o NMBN (100 µM) e não lavado, e (J) conídio tratado com NMBN (100 µM) e lavado.....47

**Figura 10 –** Tratamento dos conídios de *C. acutatum* com o FS S137 (1, 10, 50 e 100 µM). (A) conídio tratado com o S137 (1 µM) e não lavado, (B) conídio tratado com o S137 (1 µM) e, a seguir, lavado para a retirada do excesso de FS, (C) conídio tratado com o S137 (10 µM) e não lavado, (D) conídio tratado com o S137 (10 µM) e lavado (E) conídio tratado com o S137 (50 µM) e não lavado, (F) conídio tratado com S137 (50 µM) e lavado, (G) conídio tratado com o S137 (100 µM) e não lavado e (H) conídio tratado com S137 (100 µM) e lavado.....48

**Figura 11 –** (A) Irradiâncias de UV (290-400 nm) e (B) temperaturas registradas em intervalos de 1 h durante os experimentos realizados nos dias 3 e 17 de abril de 2012, entre as 11 h e as 13 h.....50

**Figura 12 –** IF de conídios de *C. acutatum*, com o 8-MOP, F1 e F2. Os conídios foram incubados com o FS e, a seguir, lavados ou não para a retirada do FS não ligado, antes de serem expostos às diferentes doses de luz. Cada valor é a média de dois experimentos e a barra indica o desvio padrão da média.....51

**Figura 13 –** IF de conídios de *C. acutatum*, com o 8-MOP, F1 e F2. Os conídios foram incubados com o FS e expostos às diferentes doses de luz. Cada valor é a média de dois experimentos e a barra indica o desvio padrão da média.....52

**Figura 14 –** IF de conídios de *A. nidulans*, com o 8-MOP, F1 e F2. Os conídios foram incubados com o FS e, a seguir, lavados ou não para a retirada do FS não ligado, antes de serem expostos às diferentes doses de luz. Cada valor é a média de dois experimentos e a barra indica o desvio padrão da média.....53

**Figura 15 –** IF de conídios de *A. nidulans*, com o 8-MOP, F1 e a F2. Os conídios foram incubados com o FS e expostos às diferentes doses de luz. Cada valor é a média de dois experimentos e a barra indica o desvio padrão da média.....54

**Figura 16 –** Conídios de *C. acutatum* tratados com (A) 8-MOP (100 µM), (B) FM®4-64 (8 µM) e (C) DAPI (3,5 mM) e observados com microscópio de fluorescência com ampliação de 1000×.....55

**Figura 17 –** Efeito da exposição simultânea ao sol e aos FS fenotiazínicos em folhas de mudas de laranja pera (*Citrus sinensis*). (A) folhas antes da aplicação, (B) imediatamente após a aplicação de MB, TBO, NMBN e S137, (C) duas horas após a aplicação, (D) 72 h após a aplicação, (E) uma semana após a aplicação e (F) três semanas após a aplicação.....56

**Figura 18 –** Efeito da exposição simultânea ao sol e ao FS 8-MOP em folhas de mudas de laranja pera (*Citrus sinensis*). (A) folhas antes da aplicação, (B) imediatamente após a aplicação de 8-MOP, fração 1 (F1) e fração 2 (F2), (C) duas horas após a aplicação, (D) 72 h após a aplicação, (E) uma semana após a aplicação e (F) três semanas após a aplicação.....57

**Figura 19 –** Aspecto dos tecidos de folhas adultas de laranja pera após a colocação dos FS (10 µL, 100 µM) na superfície adaxial. Após a secagem das soluções, foram feitos cortes transversais das folhas para a análise histológica. As folhas foram tratadas com os FS: (A) MB, (B) TBO, (C) NMBN e (D) S137. Corte transversal de folhas corados com os FS: (E) MB, (F) TBO, (G) NMBN e (H) S137.....58

**Figura 20 –** Cromatograma obtido por CG-EM da fração 1.....60

**Figura 21 –** Espectro de massas (EM) obtido por CG-EM para a substância 1 da fração 1 com $t_R$= 8,68 min e comparado com o EM contido na biblioteca de padrões.....61

**Figura 22 –** Espectro de massas (EM) obtido por CG-EM para a substância 2 da fração 1 com $t_R$= 10,56 min e comparado com o EM contido na biblioteca de padrões.....62

**Figura 23 –** Sugestão para a estrutura química das substâncias presentes na fração 1.....63

**Figura 24 –** Espectro de RMN de $^1$H (500 MHz) das substâncias presentes na fração 1, obtido em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$).....65

**Figura 25 –** Ampliação do espectro de RMN de $^1$H (500 MHz), na região do deslocamento químico de 3,48-4,08 das substâncias presentes na fração 1 obtido em $CDCl_3$.....66

**Figura 26 –** Ampliação do espectro de RMN de $^1$H (500 MHz), na região do deslocamento químico de 6,00-6,84 das substâncias presentes na fração 1, obtido em $CDCl_3$.....67

**Figura 27 –** Ampliação do espectro de RMN de $^1$H (500 MHz), na região do deslocamento químico de 7,12-7,92 das substâncias presentes na fração 1, obtido em $CDCl_3$.....68

**Figura 28 –** Mapa de contorno HMBC (500 MHz) das substâncias presentes na fração 1, obtido em $CDCl_3$.....69

**Figura 29 –** Mapa de contorno HMQC (400 MHz) das substâncias presentes na fração 1, obtido em $CDCl_3$.....70

**Figura 30 –** Cromatograma obtido por CG-EM da fração 2.....71

**Figura 31 –** Espectro de massas (EM) obtido por CG-EM para a substância da fração 2 com $t_R$= 12,29 min e comparado com o EM contido na biblioteca de padrões.....72

**Figura 32 –** Estrutura química da furanocumarina presente na fração 2 (isopimpinelina).....72

**Figura 33 –** Espectro de RMN de $^1$H (500 MHz) da furanocumarina presente na fração 2, obtido em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$).....74

**Figura 34 –** Ampliação do espectro de RMN de $^1$H (500 MHz), na região do deslocamento químico de 3,76-4,24 da furanocumarina presente na fração 2 obtido em $CDCl_3$.....75

**Figura 35 –** Espectro de RMN de $^{13}$C (125 MHz) da furanocumarina presente na fração 2, obtido em $CDCl_3$.....76

**Figura 36 –** Espectro de DEPT (125 MHz) da furanocumarina presente na fração 2, obtido em $CDCl_3$.....77

**Figura 37 –** Mapa de contorno HMBC (500 MHz) da furanocumarina presente na fração 2, obtido em $CDCl_3$.....78

**Figura 38 –** Mapa de contorno HMQC (500 MHz) da furanocumarina presente na fração 2, obtido em $CDCl_3$.....79

**Figura 39 –** Sobrevivência relativa das linhagens de *Colletotrichum acutatum* após exposição às doses de 6,5, 13, 19,4, 25,9 e 38,9 kJ $m^{-2}$ de UV. Os valores são as médias de três experimentos independentes e a barra indica o desvio padrão da média.....80

**Figura 40 –** Numero de conídios produzidos por 0,5 $cm^2$ das colônias que cresceram expostas à luz visível (12 h claro/12 h escuro) ou em completa escuridão. Os valores são as médias de contagem de três placas independentes.....81

**Figura 41 –** Espectros de absorção da mucilagem produzida em 0,5 $cm^2$ de colônias que cresceram expostas à luz visível (12 h claro/12 h escuro) ou em completa escuridão.....82

**Figura 42 –** Sobrevivência relativa de conídios das linhagens CA T-2 e CA B-3 de *C. acutatum* produzidos por colônias que cresceram no escuro e com fotoperíodos de 12 h (claro/escuro), após duas e três horas de exposição à radiação UVB. Os valores são as médias de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão das médias.....83

**Figura 43 –** Sobrevivência relativa de conídios das linhagens CA T-2 de *C. acutatum*, ARSEF 324 de *M. acridum* e ATCC 10074 de *A. nidulans*, produzidos por colônias que cresceram no escuro e por colônias que cresceram com fotoperíodos de 12 h (claro/escuro), após uma, duas e três horas de exposição à radiação UVB (doses de 6,5, 13 e 19,4 kJ $m^{-2}$ respectivamente). Os valores são as médias de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão das médias.....85

**Figura 44 –** Sobrevivência relativa de conídios da linhagem CA T-2 de *C. acutatum* produzidos por colônias que cresceram no escuro e por colônias que cresceram com fotoperíodos de 12 h (claro/escuro), após três, cinco, sete e nove horas de exposição à radiação UVB (doses de 19,4, 32,4, 45,4 e 58,3 kJ $m^{-2}$ respectivamente). Os valores são as médias de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão das médias.....86

# LISTA DE TABELAS

**Tabela 1 –** Frações da água de saída da concentradora obtidas por cromatografia líquida clássica (CLC).....29

**Tabela 2 –** Frações obtidas por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) a partir da fração 3 da CLC.....30

**Tabela 3 –** Frações obtidas por cromatografia líquida clássica (CLC) a partir da fração 4 da CLC.....30

**Tabela 4 –** Potencial zeta dos conídios de *Colletotrichum acutatum, C. gloeosporioides* e *A. nidulans*.....38

**Tabela 5 –** Concentração fungicida mínima (µM) dos FS MB, TBO, NMBN, S137 e 8-MOP, na ausência de luz, para os conídios de *Colletotrichum acutatum, C. gloeosporioides* e de *A. nidulans*.....39

**Tabela 6 –** CFM (µM) dos FS MB, TBO e NMBN para a IF dos conídios de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *A. nidulans*, utilizando-se LED brancos como fonte de luz e doses de 5 e 10 J $cm^{-2}$. A CFM é expressa como intervalo das CFM observado em três experimentos independentes.....40

**Tabela 7 –** CFM (µM) dos FS MB, TBO, NMBN e S137 para a IF dos conídios de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *A. nidulans*, utilizando-se o LED600 como fontes de luz e doses de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 J $cm^{-2}$. A CFM é expressa como intervalo das CFM observado em três experimentos independentes.....41

**Tabela 8 –** Intervalo da CFM (µM) do FS 8-metoxipsoraleno para os conídios de *C. acutatum, C. gloeosporioides* e *A. nidulans*, utilizando-se duas lâmpadas fluorescentes UVA como fontes e doses final de luz de 7,2, 9,9 e 11,8 J $cm^{-2}$.....42

**Tabela 9 –** Composição química da fração 1.....61

**Tabela 10 –** Dados de RMN de $^{1}H$ obtidos pela análise do espectro das substâncias presentes na fração1.....63

**Tabela 11 –** Dados de RMN de $^{1}H$ e $^{13}C$ obtidos pela análise dos espectros da furanocumarina isopimpinelina.....73

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| % | Porcentagem |
| × | Vezes |
| °C | Grau Celsius |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| µm | Micrometro |
| µM | Micromolar |
| $^{13}C$ | Carbono 13 |
| $^{1}H$ | Hidrogênio |
| 8-MOP | 8-Metoxipsoraleno |
| AcOEt | Acetato de etila |
| APDT | Antifungal photodynamic treatment |
| ARSEF | Agricultural research service collection of entomopathogenic fungal cultures |
| ATCC | American type culture collection |
| CCDC | Cromatografia em camada delgada comparativa |
| CCDP | Cromatografia em camada delgada preparativa |
| $CDCl_3$ | Clorofórmio deuterado |
| CFM | Concentração fungicida mínima |
| CG | Cromatografia gasosa |
| CIM | Concentração inibitória mínima |
| CLC | Cromatografia líquida clássica |
| CLSI | Clinical and laboratory standards institute |
| cm | Centímetros |
| *Z* | Os substituintes de maior prioridade estão do mesmo lado (Configuração *Z*) |
| *d* | Dubleto |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole (corante fluorescente) |

| | |
|---|---|
| *dd* | Duplo dubleto |
| DEPT | Distortionless enhancement by polarization transfer |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico (Desoxyribonucleic acid) |
| EM | Espectrometria de massas |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| eV | Eletron volt |
| F1 | Fração 1 (7-metoxicumarina e 5,7-dimetoxicumarina) |
| F2 | Fração 2 (isopimpinelina) |
| FM®4-64 | Lipophilic Styryl Dyes (corante fluorescente) |
| FS | Fotossensibilizador |
| g | Grama |
| *g* | Gravidade |
| h | Horas |
| $H_2SO_4$ | Ácido sulfúrico |
| HMBC | Heteronuclear multiple bond coherence |
| HMQC | Heteronuclear multiple quantum coherence |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| Hz | Hertz |
| IF | Inativação fotodinâmica |
| IS | Índice de similaridade |
| J | Joules |
| *J* | Constante de acoplamento (em Hz) |
| kJ | Kilojoules |
| KOH | Hidróxido de potássio |
| L | Litro |
| LED | Light-emitting diodes |
| m | Metro |

| | |
|---|---|
| M | Molar |
| m/v | Relação massa-volume |
| *m/z* | Relação massa-carga |
| MB | Azul de metileno (Methylene blue) |
| mg | Miligrama |
| MHz | Mega hertz |
| min | Minutos |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| mV | Milivolts |
| mW | Miliwatts |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| nm | Nanometro |
| NMBN | Novo azul de metileno (New methylene blue N) |
| PBS | Salina tamponada com tampão fosfato (Phosphate buffered saline) |
| PDA | Potato dextrose agar |
| PDAY | Potato dextrose agar acrescido de yeast extract |
| PFC | Podridão floral dos citrus |
| pH | Potencial de hidrogênio iônico |
| PHT | Fenileptarina |
| RMN | Ressonância magnética nuclear |
| rpm | Rotações por minuto |
| RPMI | Meio de cultura roswell park memorial institute |
| *s* | Singleto |
| $S_0$ | Estado fundamental |
| $S_1$ | Estado excitado singleto |

| | |
|---|---|
| S137 | Derivado do azul de metileno não comercial |
| $T_1$ | Estado excitado tripleto |
| TBO | Azul de toluidina O (Toluidine blue O) |
| TF | Tratamento fotodinâmico |
| UFC | Unidades formadoras de colônias |
| UV | Ultravioleta |
| UVA | Fração do espectro ultravioleta entre os comprimentos de onda 400 e 320 nm |
| UVB | Fração do espectro ultravioleta entre os comprimentos de onda 320 e 290 nm |
| v/v | Relação volume-volume |
| W | Watts |
| $\delta$ | Deslocamento químico |

**Sumário**

**RESUMO**..... i
**ABSTRACT**..... ii
**RESUMEN**..... iii
**LISTA DE FIGURAS**..... iv
**LISTA DE TABELAS**..... viii
**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**..... ix
**1. Introdução**..... 1
**1.1. Sistemas Biológicos**..... 2
**1.2. Fotossensibilizadores**..... 6
**1.3. Fotossensibilização**..... 8
**1.4. Inativação fotodinâmica de fungos**..... 9
**1.5. Efeito da radiação UV em conídios de fungos**..... 12
**2. Objetivos**..... 14
**2.1. Objetivo geral**..... 14
**2.2. Objetivos específicos**..... 14
**3. Materiais e Métodos**..... 16
**I. Inativação fotodinâmica de conídios**..... 16
**3.1. Espécies utilizadas e condições de crescimento**..... 16
**3.2. Fotossensibilizadores**..... 16
**3.3. Fontes artificiais de luz**..... 19
**3.4. Determinação do potencial zeta dos conídios**..... 20
**3.5. Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico dos conídios com os FS fenotiazínicos pela da concentração fungicida mínima (CFM)**..... 20
**3.6. Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico dos conídios com o FS 8-metoxipsoraleno pela concentração fungicida mínima (CFM)**..... 21
**3.7. Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico dos conídios pela fração de sobreviventes**..... 22
**3.7.1. Fenotiazínicos**..... 22
**3.7.2. Furanocumarinas e cumarinas**..... 23
**3.8. Determinação da localização subcelular dos FS nos conídios de *C. acutatum***..... 24
**3.9. Efeito da aplicação dos FS na superfície de folhas adultas de mudas de laranja pera (*Citrus sinensis*)**..... 25
**3. 9. 1. Estudos histológicos de folhas de laranja pera (*Citrus sinensis*) após tratamento com os FS fenotiazícos**..... 26
**3.10. Extração de furanocumarinas e cumarinas de óleos essenciais, subprodutos e resíduos industriais do processamento do limão Tahiti (*Citrus latifolia*)**..... 26
**3.10.1. Determinação da melhor fonte para extração de furanocumarinas e cumarinas**..... 26
**3.10.2. Extração de furanocumarinas e cumarinas da água da saída da concentradora**..... 28
**3.11. Elucidação das estruturas das substancias extraídas**..... 31
**3.12. Estudo de espectroscopia de absorção no UV e no visível e espectroscopia de emissão de fluorescência das furanocumarinas e cumarinas extraídas do limão Tahiti**..... 32
**II. Fotobiologia de *Colletotrichum acutatum***..... 33
**3.13. Linhagens utilizadas e condições de crescimento**..... 33

**3.14. Câmara de irradiação UV, lâmpadas e filtro..... 33**
**3.15. Avaliação da tolerância à radiação UVB dos conídios de *C. acutatum*..... 34**
**3.16. Efeito da exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *C. acutatum* na produção de conídios e de mucilagem..... 35**
**3.17. Efeito da exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *C. acutatum* na tolerância à radiação UVB dos conídios produzidos..... 35**
**3.18. Efeito da exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *C. acutatum, M. acridum* e *A. nidulans* na tolerância à radiação UVB dos conídios produzidos..... 36**
**3.19. Exposições de colônias esporuladas de *C. acutatum* à radiação UVB e avaliação da sobrevivência dos conídios..... 37**
**3.20. Análise estatística..... 37**
**4. RESULTADOS..... 38**
**I. Inativação fotodinâmica de conídios..... 38**
**4.1. Determinação do potencial zeta dos conídios..... 38**
**4.2. Avaliação da eficácia do TF dos conídios pela CFM..... 38**
**4.2.1. Efeito das exposições apenas à luz e apenas aos FS na sobrevivência dos conídios..... 38**
**4.2.2. Efeito das exposições simultâneas à luz e aos FS fenotiazínicos na sobrevivência dos conídios..... 39**
**4.2.3. Efeito das exposições simultâneas à luz e ao 8-metoxipsoraleno na sobrevivência dos conídios..... 42**
**4.3. Avaliação da eficácia do TF dos conídios pela fração de sobreviventes..... 43**
**4.3.1. Fenotiazínicos..... 43**
**4.3.2. Furanocumarina e cumarinas..... 49**
**4.4. Efeito da aplicação dos FS na superfície de folhas adultas de mudas de laranja pera (*Citrus sinensis*)..... 55**
**4.4.1. Estudos histológicos de folhas de laranja pera (*Citrus sinensis*) após tratamento com os FS fenotiazícos..... 57**
**4.5. Extração de furanocumarinas e cumarinas de produtos, subprodutos e resíduos do processamento industrial do limão Tahiti (*Citrus latifolia*)..... 59**
**4.5.1. Determinação da melhor fonte para extração de furanocumarina e cumarinas..... 59**
**4.5.2. Extração de furanocumarina e cumarina da água da saída da concentradora..... 59**
**II. Fotobiologia de *C. acutatum*..... 80**
**4.6. Avaliação da tolerância à radiação UVB dos conídios de *C. acutatum*..... 80**
**4.7. Efeito da exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *C. acutatum* na produção de conídios e de mucilagem..... 81**
**4.8. Efeito da exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *C. acutatum* na tolerância à radiação UVB dos conídios produzidos..... 82**
**4.9. Efeito da exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *C. acutatum, A. nidulans* e *M. acridum*, na tolerância à radiação UVB dos conídios produzidos..... 83**
**4.10. Exposições de colônias esporuladas de *C. acutatum* à radiação UVB e avaliação da sobrevivência dos conídios..... 85**
**5. Discussão..... 87**
**I. Inativação fotodinâmica de conídios..... 87**

**II. Fotobiologia de *C. acutatum*..... 94**
**6. Referências bibliograficas..... 97**
**APÊNDICES..... 110**

## 1. Introdução

O estudo da fotobiologia de fungos tem adquirido importância crescente nos últimos anos, tanto por fornecer contribuições relevantes para o entendimento do efeito das radiações visível e UV nas células eucarióticas (BRAGA et al., 2006; SCHIAVE et al., 2009; RANGEL et al., 2011), como pelo surgimento de novas áreas com aplicações importantes, como é o caso da inativação fotodinâmica (IF) de microrganismos, que utiliza fotossensibilizadores (FS) para o controle de fungos e bactérias (JORI, 2006; XU et al., 2009; SMIJS; PAVEL, 2011; St. DENIS et al., 2011; DAI, et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012). A aplicação intensiva de fungicidas é o método mais utilizado para o controle de antracnose e da podridão floral dos cítrus (PFC), que são doenças causadas por espécies de *Colletotrichum*. Apesar da aplicação intensiva de fungicidas, nem sempre tem sido 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 (FERNANDES; SANTOS; RIBEIRO, 2002; AZEVEDO et al., 2006). Adicionalmente, o uso intensivo e/ou inapropriado dos fungicidas químicos tem provocado a intoxicação de homens e animais e a contaminação de alimentos e do ambiente (GHINI; KIMATI, 2000). Nesse cenário, o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de fungos fitopatogênicos é extremamente desejável. 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.

## 1.1. Sistemas Biológicos

***Aspergillus nidulans*.** Algumas espécies do gênero *Aspergillus* são patógenos oportunistas de humanos. Embora *A. fumigatus* seja o principal agente etiológico de doenças, outras espécies do gênero, como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. nidulans*, também são responsáveis por micoses invasivas, muitas vezes fatais, em indivíduos imunocomprometidos (VALK et al. 2008). Em conjunto, as espécies do gênero *Aspergillus* são responsáveis por grande parte das micoses invasivas causadas por fungos miceliais em humanos (ENOCH et al. 2006). O sequenciamento do genoma de *A. nidulans* e a disponibilização de ferramentas para estudos de suas genômica e proteômica aumentaram muito a importância da utilização da espécie em programas para o desenvolvimento de novos fungicidas e de novas estratégias para o controle de fungos filamentosos (GALAGAN et al., 2005; NIERMAN et al., 2005).

*A. nidulans* reproduz-se tanto sexuadamente, por meio da produção de ascósporos, como assexuadamente, por meio da produção de conídios. Além de importantes para a reprodução, os conídios também estão envolvidos na dispersão e persistência ambiental de diversas espécies de fungos filamentosos. Em muitas espécies patogênicas, os conídios são também as estruturas responsáveis pela infecção do hospedeiro (BRAGA et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2010; BARROS et al., 2010). As espécies do gênero *Aspergillus* apresentam ampla distribuição geográfica e podem ser isoladas de uma grande variedade de substratos, como solo e matéria orgânica em decomposição. A facilidade de dispersão e o pequeno tamanho dos conídios fazem com que permaneçam suspensos no ar por muito tempo, o que torna a sua inalação bastante comum. A inalação dos conídios de *Aspergillus* normalmente não produz manifestações clínicas importantes, mas, eventualmente, pode causar alergias, traqueobronquite, aspergiloma e aspergilose invasiva, tanto em indivíduos imunocompetentes, como em imunocomprometidos (AKTAS, YIGIT, 2009).

***Colletotrichum* spp.** *Colletotrichum* é um gênero de fungos ascomicetos (teleomorfo: *Glomerella*) que contém espécies que estão entre as mais bem sucedidas entre os fungos fitopatogênicos, causando perdas econômicas importantes em regiões agrícolas tropicais, subtropicais e temperadas (WHARTON, DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). As espécies de *Colletotrichum* apresentam uma ampla distribuição geográfica e são extremamente diversas, incluindo espécies saprofíticas e fitopatogênicas (SILVA et al., 2006). Dentre as principais espécies fitopatogênicas do gênero, destacam-se *Colletotrichum acutatum e C. gloeosporioides*, que ocorrem em diversas espécies de hospedeiros, incluindo-se culturas agrícolas de grande importância econômica (cítrus, morango, manga, pêssego, goiaba), plantas medicinais e arbustos e árvores silvestres. Os fungos podem causar podridões de caules e frutos, seca de ponteiros, manchas foliares, infecções latentes e antracnose (doença que é caracterizada por lesões necróticas profundas e delimitadas nos tecidos) (DOMINGUES, 2001).

Os fungos formam colônias variáveis, de coloração branco-gelo (*C. gloeosporioides*) ou alaranjada (*C. acutatum*) e micélios aéreos, geralmente uniformes, de aparência aveludada (ALMEIDA, COELHO, 2007). A reprodução assexuada dos fungos *C. acutatum e C. gloeosporioides* ocorre por meio da produção de conídios hialinos e unicelulares. 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. Diversos estudos têm mostrado que a matriz produzida por diversas espécies de fitopatógenos está envolvida na tolerância dos conídios à radiação solar, à variações de temperatura e à dissecação (MENEZES, 2006). Mondal e Parbery (2005) reportaram que a matriz protege os conídios de *C. musae* durante exposições a temperaturas extremas e à radiação UVB. Metabólitos secundários presentes na matriz, como a gloeosporone, inibem a germinação dos conídios de *C. gloeosporioides* (GARCIA-PAJÓN, COLLADO, 2003). A dispersão dos

conídios ocorre pela água da chuva ou de irrigação (que solubiliza a matriz, separando os conídios em respingos), insetos, vento, utensílios agrícolas e manuseio das culturas. (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004; PANDEY; ARORA; DUBEY,1997). O estágio sexual de *C. acutatum* nunca foi encontrado na natureza (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004).

Os prejuízos causados pelo gênero *Colletotrichum*, em especial em países tropicais, resultam tanto da redução direta da qualidade e/ou quantidade dos produtos, como do aumento dos custos de produção e das perdas no pós-colheita, por infecções latentes que não foram detectadas durante o cultivo. A perda no pós-colheita chega à ordem de 30% dos produtos comercializados (ALMEIDA, 2002; SILVA et al., 2006).

A antracnose causada por espécies de *Colletotrichum* é a principal doença de frutos em pós-colheita, sendo considerada uma doença de elevada importância econômica no Brasil (SERRA; COELHO; MENEZES, 2008). O sintoma típico da doença é caracterizado por lesões arredondadas, grandes, necróticas, com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada. Também pode ocorrer uma podridão-mole nos frutos, prejudicando a sua comercialização. A espécie comumente relacionada à doença é *C. gloeosporioides* (LIMA FILHO; OLIVEIRA; MENEZES, 2003). Além da antracnose, espécies de *Colletotrichum* causam a podridão floral dos cítrus (PFC), que, sob determinadas condições ambientais (períodos de chuvas ou com alta umidade > 90%), constitui um fator limitante à produção em várias áreas citrícolas. A PFC caracteriza-se pela presença de lesões de coloração laranja-amarronzada nas pétalas das flores abertas. Após a infecção das flores, os frutos recém-formados caem. A espécie comumente relacionada à doença é a *C. acutatum* (AGOSTINI et al., 1992; TIMMER et al., 1994). O limão Siciliano (*Citrus limom*) e a lima ácida Tahiti (*Citrus aurantifolia*) são as variedades mais suscetíveis à PFC, seguidas das laranjas doces (LARANJEIRA et al., 2005). Entre as laranjas doces, as

variedades tardias e as variedades que apresentam vários surtos de florescimento, como a laranja Pera (*Citrus sinensis*), são mais sujeitas ao ataque do fungo (SPÓSITO et al., 2006).

A aplicação intensiva de fungicidas é o método mais utilizado para o controle da antracnose e da PFC no Brasil. Os fungicidas registrados 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). Apesar da aplicação intensiva de fungicidas, nem sempre é possível evitar a ocorrência de epidemias causadas por *Colletotrichum* devido à emergência de isolados tolerantes aos princípios ativos utilizados (FERNANDES; SANTOS; RIBEIRO, 2002; AZEVEDO et al., 2006).

A citricultura constitui um importante segmento na estrutura sócioeconômica do Brasil, que, nas últimas décadas, assumiu a liderança mundial de produção de laranjas. A produção na safra de 2010 foi aproximadamente 19,1 milhões de toneladas, e o estado de São Paulo foi responsável por aproximadamente 14,8 milhões de toneladas (IBGE, 2011). Segundo Neves e colaboradores (2010), além do suco e dos frutos *in natura*, são comercializados subprodutos da laranja obtidos durante o processo de industrialização, como farelo, óleos essenciais e líquidos aromáticos. Esses produtos são usados como solventes industriais, componentes aromáticos e para a obtenção de sabores artificiais, na indústria farmacêutica e alimentícia.

Nos últimos anos, a citricultura mundial e a brasileira, de maneira particular, vem enfrentando seríssimos problemas fitossanitários, que incluem as doenças causadas por espécies de *Colletotrichum*. A importância econômica da citricultura e as dificuldades que vêm sendo observadas no controle de fitopatógenos com os fungicidas disponíveis justificam os estudos para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de fungos, baseadas em mecanismos de ação diferentes dos apresentados pelos fungicidas convencionais.

**1.2. Fotossensibilizadores**

Embora o conceito de morte celular induzida pela interação entre a luz e substâncias químicas seja conhecido há mais de um século (ACKROYD et al., 2001), o interesse por FS tem aumentado nos últimos anos, devido ao uso desse grupo de substâncias para o tratamento de tumores malignos e para o controle de microrganismos em diversos sistemas biológicos (VENEZIO et al., 1985; ZEINA et al., 2001; BLISS et al., 2004; TEGOS et al., 2005; DAI et al., 2009; HUANG et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012).

FS são compostos atóxicos ou pouco tóxicos, 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, o que leva a uma série de transferências moleculares de energia que normalmente induzem a produção de oxigênio singleto, 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 rápida eliminação do FS pelas células não-alvo, a ativação num comprimento de onda considerado ótimo para a absorção celular e a alta capacidade de produção de oxigênio singleto são as características que se desejam no FS ideal (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992).

Os FS fenotiazínicos possuem estruturas tricíclicas simples e planas, normalmente catiônicas, como mostra a Figura 1. Dentre os fenotiazínicos utilizados para a IF de fungos estão o azul de metileno (MB), azul de toluidina (TBO) e o novo azul de metileno (NMBN) e 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 (S137) (GONZALES et al., 2010). São moléculas que têm uma boa eficiência na produção de espécies reativas de

oxigênio e têm absorção máxima entre 625 a 660 nm (DONNELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008).

O MB e o TBO têm sido utilizados com sucesso no tratamento de micoses orais causadas por *Candida albicans* (WAINWRIGHT, 1996; WAINWRIGHT, 1998; WILSON; MIA, 1993; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005b; DONNELLY et al., 2007; PRATES et al., 2011b; DAI; et al., 2012) e na inativação de conídios de fungos filamentosos (GONZALES et al., 2010).

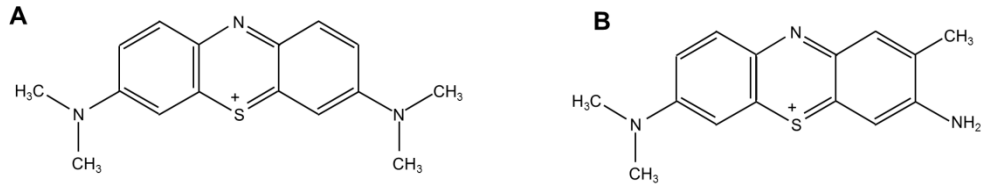


**Figura 1 –** Estrutura química dos FS fenotiazínicos (A) azul de metileno e (B) azul de toluidina

Díversos gêneros de plantas, incluindo *Citrus*, produzem FS, como as furanocumarinas (psoralenos), que podem causar fotodermatite (BINNS et al., 2000; WAINWRIGHT, 1998). O primeiro composto da classe das cumarinas foi isolado por Vogel, em 1820, de vegetais da espécie *Coumarona odorata* (RIBEIRO; KAPLAN, 2002). Diversos derivados de cumarinas têm sido sintetizados e apresentam aplicações biotecnológicas variadas (VIJILA et al., 2001; GAO; LI; YANG, 2000). O isolamento e a identificação desses compostos, como as furanocumarinas, representam um dos maiores avanços na área da terapia fotodinâmica (WAINWRIGHT, 1998). Os derivados furanocumarínicos, como os psoralenos (Figura 2), estão sendo utilizados no tratamento de vitiligo e psoríase e, mais recentemente, na IF de microrganismo (HANAWA et al., 2002).

**Figura 2 –** Estrutura típica de uma cumarina (A) e de um psoraleno (furanocumarina) (B).

### 1.3. Fotossensibilização

O processo de fotossensibilização baseia-se na combinação de três elementos: FS, capaz de se acumular seletivamente ou ser preferencialmente metabolizado pelas células-alvo; luz com comprimentos de onda adequados, capaz de ativar o FS, e oxigênio molecular. A ativação do FS na presença do oxigênio leva à produção de espécies ativas do oxigênio, como o ânion superóxido e o oxigênio singleto, capazes de matar ou inativar as células-alvo (OLIVEIRA; MACHADO; PESSINE, 2005). Dependendo do FS utilizado, a ativação pode ser obtida por meio de exposições à luz branca policromática ou às radiações monocromáticas (KOCHEVAR *et al.*, 1996). Após absorver um fóton, a molécula do FS passa do estado fundamental ($S_0$) para o estado excitado singleto ($S_1$). O FS pode perder sua energia de excitação por vários processos radiativos (fluorescência, fosforescência) ou não radiativos (interconversão e cruzamento inter-sistemas). Por meio do processo de cruzamento inter-sistemas, a molécula do FS pode passar 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 uma ou de duas vias, conhecidas por fotoprocessos do Tipo I e do Tipo II. Ambos os processos requerem oxigênio para ocorrerem. O fotoprocesso do Tipo I envolve reações de transferência de elétrons do estado tripleto do fotossensibilizador, com a participação de um substrato, para produzir radicais iônicos que podem reagir com o oxigênio, produzindo espécies citotóxicas, como o superóxido, a hidroxila e radicais derivados de lipídios. O fotoprocesso do Tipo II envolve transferência de energia do estado tripleto do FS

para o oxigênio molecular com nível basal de energia, produzindo o estado excitado oxigênio singleto, que é capaz de oxidar diversas biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, levando à citotoxicidade (HAMBLIN et al., 2002, DONNELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008).

Para que um FS possa ser utilizado com sucesso em um determinado sistema biológico (por exemplo, para inativar estruturas fúngicas de uma determinada espécie), é essencial que sejam determinados parâmetros funcionais como: (1) concentração do fotossensibilizador; (2) duração do período de incubação do fotossensibilizador com as células, antes da exposição à luz; (3) intensidade e espectro da radiação utilizada durante a fotossensibilização e (4) duração do período de exposição. A determinação dos parâmetros funcionais mais adequados para serem utilizados durante a inativação fotodinâmica de fungos de interesse fornece subsídios importantes para o desenvolvimento da técnica e de novas estratégias para o controle desses microrganismos.

### 1.4. Inativação fotodinâmica de fungos

O uso de FS para a eliminação de microrganismos antecede a quimioterapia antimicrobiana baseada na utilização de antibióticos. A primeira demonstração da IF de células microbianas foi descrita em 1900, por Oscar Raab, que observou que corantes, como a acridina e a eosina, inativavam rapidamente paramécios na presença de luz (HOCKBERGER, 2002; MAISCH et al., 2004). A IF de microrganismos baseia-se no princípio de que, se um microrganismo demonstra seletividade por um determinado corante, que também é FS, deve ser possível destruí-lo, expondo-o à luz após a aplicação do corante. (WAINWRIGHT, 2000).

A IF de fungos requer a aplicação de um FS que se liga à superfície celular ou que se acumula no interior das células do fungo-alvo (GONZALES et al., 2010). O uso da IF para matar estruturas fúngicas, como conídios, ascósporos e micélio e para o tratamento de

micoses é uma aplicação recente e promissora da técnica (SMIJS; SCHITMAKER, 2003; SMIJS et al., 2004; SMIJS et al., 2007; SMIJS et al., 2008; SMIJS et al., 2009; GONZALES et al., 2010; SMIJS; PAVEL, 2011).

As características físico-químicas da superfície e da parede dos conídios (por exemplo, composição química, carga e hidrofobicidade) diferem muito das características de células vegetativas de leveduras e de hifas de fungos filamentosos. A parede celular dos conídios de muitas espécies de fungos, como *A. nidulans*, é extremamente hidrofóbica e possui superfície com cargas negativas (BOUCIAS; PENDLAND; LATGE, 1988; GIRARDIN et al., 1999; SHAH et al., 2007). A superfície externa dos conídios é formada por uma camada organizada composta por hidrofobinas. As hidrofobinas fazem parte de uma família de pequenas proteínas anfifílicas com porções hidrofílicas e porções hidrofóbicas (GIRARDIN et al., 1999; PARIS et al., 2003). Outras moléculas, como açúcares e lipídios, fazem parte da superfície de conídios, ascósporos e hifas e desempenham papel importante na determinação de suas características físico-químicas (BOUCIAS; PENDLAND; LATGE, 1988; GIRARDIN et al., 1999). Tanto a composição química como a organização da parede celular varia muito entre espécies e entre os diferentes estágios de desenvolvimento dos fungos (BOUCIAS; PENDLAND; LATGE, 1988;. SHAH et al., 2007; DAGUE et al., 2008).

Embora diversos aspectos dos mecanismos moleculares da inativação fotodinâmica de fungos responsáveis pelos efeitos biológicos continuem desconhecidos, diversos trabalhos foram feitos para entender como diferentes FS interagem com a célula fúngica, tanto antes, como durante a fotossensibilização. Também foram conduzidos estudos para identificar as moléculas e estruturas celulares danificadas durante o processo. As características físico-químicas da superfície celular influenciam na seletividade e eficácia de vários FS (USACHEVA et al., 2001; USACHEVA et al., 2003; FUCHS et al., 2007; USACHEVA et al., 2008). A membrana plamática e a parede celular são carregadas negativamente, o que

favorece a ligação de FS catiônicos, como MB, TBO e diversos outros derivados. O TBO liga-se instantaneamente a polifosfatos localizados na superfície externa da membrana plasmática da levedura *Saccharomyces fragilis* (TIJSSEN et al., 1981). Ito (1977) verificou que o TBO não penetra na célula de *S. cerevisiae* e atribuiu toda a atividade fotodinâmica do FS à sua ação iniciada no meio extracelular. Durante a fotossensibilização de conídios de *A. nidulans*, FS como MB e TBO não se ligam à superfície e nem penetram na célula. Nesses casos, a inativação dos conídios é decorrente da produção de espécies reativas de oxigênio 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 seja danificada, o que pode ocorrer ao longo da fotossensibilização (JORI, 2006). Smijs et al. (2008) relataram severas deformidades e ruptura da parede celular, tanto em microconídios, como de micélio após fotossensibilização com o FS catiônico Sylsens B. O efeito foi observado após a ligação da porfirina catiônica às cargas negativas da superfície externa das paredes de conídios e hifas.

Existem casos em que o FS penetra na célula microbiana. Quando isso ocorre, ele pode associar-se fortemente às estruturas subcelulares, que serão danificadas preferencialmente durante a fotossensibilização, ou pode ser eliminado pela célula por meio de mecanismos ativos de transporte. A eliminação por bombas de efluxo, entretanto, está limitada a células metabolicamente ativas, devendo ter importância limitada, se tiver, em células dormentes, como esporos de bactérias e conídios de fungos filamentosos. Tegos et al. (2008) demonstraram que inibidores de bombas de efluxo aumentam a eficácia da fotossensibilização com fenotiazínicos.

As informações atualmente disponíveis sobre a inativação fotodinâmica de fungos filamentosos são muito limitadas. A extensão dos estudos para novas espécies de fungos,

como as fitopatogênicas, e a identificação de FS que possam ser utilizados como fungicidas são importantes para o desenvolvimento da técnica.

### 1.5. Efeito da radiação UV em conídios de fungos

Caso a IF venha a ser utilizada, em condições de campo, para o controle de fitopatógenos, a ativação do FS dar-se-á pela radiação solar. O espectro solar que atinge a superfície do planeta engloba as frações UVB (290-320 nm), UVA (320-400 nm) e radiação visível (400-700 nm). Independentemente da eficácia da IF ou do FS utilizado, os efeitos deletérios da radiação UV sobre os microrganismos estarão sobrepostos aos efeitos do tratamento fotodinâmico. Desta forma, mesmo sob a perspectiva da inativação fotodinâmica, é interessante a determinação dos efeitos deletérios das fração UVA e UVB da radiação solar nos conídios das espécies estudadas.

As diferentes frações espectrais da radiação solar apresentam diversos efeitos nas diferentes fases do desenvolvimento e nas diferentes estruturas dos fungos filamentosos (BRAGA et al., 2001a). Exposições a intensidades moderadas de radiação visível durante o desenvolvimento podem induzir a produção de fotoprotetores, aumentar a produção de conídios e aumentar a tolerância dos conídios produzidos à ao calor e à radiação UV (KIHARA et al., 2004; OREN; GUNDE-CIMERMAN, 2007; RANGEL et al., 2011). Esses efeitos de exposições à luz visível variam muito entre as diferentes espécies de fungos.

Dados a respeito dos efeitos da radiação UV em conídios de espécies do gênero *Colletotrichum* são muito limitados. Entretanto, está bem estabelecido, para outras espécies de fungos, que a radiação solar é um dos principais fatores responsável pelo controle do tamanho e da dispersão de populações naturais de fungos. Os efeitos deletérios da fração UVA e UVB da radiação solar sobre fungos, particularmente sobre os conídios, são relativamente bem conhecidos (BRAGA et al., 2001b; BRAGA et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2010;

RANGEL et al., 2011). Exposições diretas, por poucas horas, a intensidades de radiação UV encontradas no meio ambiente podem matar os conídios da maioria das espécies estudadas. Os conídios são mortos tanto pela radiação UVA como pela radiação UVB (BRAGA et al., 2001c). Além de matar os conídios, exposições a doses subletais de radiação podem provocar diversos efeitos adversos, incluindo a redução na velocidade de germinação e de desenvolvimento do micélio. Também ocorre a diminuição da capacidade infectiva dos conídios e redução da virulência em espécies patogênicas (BRAGA et al., 2001b). Como a radiação UV limita o tamanho das populações e a dispersão de populações de importantes espécies de fungos fitopatogênicos, seus efeitos são importantes, tanto do ponto de vista ecológico, como do ponto de vista fitossanitário (PARNELL et al., 1998; WILLOCQUET et al., 1996; PAUL et al., 1997).

# 2. OBJETIVOS

## 2.1. Objetivos gerais

Avaliar os efeitos do tratamento fotodinâmico com FS fenotiazínicos, cumarínicos e furanocumarínicos em conídios dos fungos *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* e *A. nidulans* e iniciar estudos de fotobiologia com *C. acutatum*.

## 2.2. Objetivos específicos

- 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 conídios.

- Desenvolver um processo piloto para extrair FS do grupo das cumarinas e furanocumarinas de resíduos do processamento industrial do limão Tahiti.

- Avaliar a eficácia do TF com os FS fenotiazínicos, cumarínicos e furanocumarínicos para matar os conídios das diferentes espécies.

- Estudar as interações entre os diferentes FS e os conídios das diferentes espécies e determinar a localização intracelular dos FS.

- Avaliar o efeito de exposições à radiação UVB na sobrevivência dos conídios de diferentes linhagens de *C. acutatum*.

- Avaliar o efeito da exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *Colletotrichum acutatum* na produção de conídios, na produção de mucilagem e na tolerância à radiação UVB dos conídios produzidos.

# 3. Materiais e Métodos

## I - Inativação fotodinâmica de conídios

### 3.1. Espécies utilizadas e condições de crescimento

Os experimentos foram realizados com as linhagens CA 1209 de *Colletotrichum acutatum*, CG 1 de *C. gloeosporioides* e ATCC 10074 de *Aspergillus nidulans*. As linhagens de *Colletotrichum* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior, do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". A linhagem de *A. nidulans* foi adquirida da "American Type Culture Collection" (ATCC) (Manassas, VA, EUA). Todas as espécies foram crescidas em meio "Potato Dextrose Agar" (PDA) (Difco BD, EUA), acrescido de extrato de levedura 1 g $L^{-1}$ (PDAY) (Difco BD, EUA) a 28°C, por 5 dias, em fotoperíodo de 12 h (claro / escuro). A iluminação foi fornecida por duas lâmpadas fluorescentes Daylight Plus F30W/155-T8 (Sylvania, Germany). Após o crescimento, os conídios foram cuidadosamente removidos e suspensos em solução 0,01% (v/v) de Tween 80 e a concentração da suspensão foi determinada por contagens em hematímetro.

### 3.2. Fotossensibilizadores

Os experimentos foram realizados com os FS fenotiazínicos, comerciais (1) azul de metileno (methylene blue, MB) ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA); (2) novo azul de metileno N (new methylene blue N zinc choride double salt, NMBN) ($C_{18}H_{22}ClN_3S$) (Sigma, EUA); (3) azul de toluidina O (toluidine blue O, TBO) ($C_{15}H_{16}N_3SCl$) (Sigma, EUA); (4) o 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 (S137) ($C_{28}H_{39}O_4N_3S_2$); e (5) psoraleno comercial 8-metoxipsoraleno (8-methoxypsoralen, 8-MOP) ($C_{12}H_8O_4$) (Sigma, EUA). Também foram utilizadas duas frações extraídas da água da saída

da concentradora, que é um resíduo industrial do processamento do limão Tahiti. Os dados espectroscópicos sugeriram que a fração 1 (F1) é constituída pelos compostos 7-metoxicumarina ($C_{10}H_8O_3$) e 5,7-dimetoxicumarina ($C_{11}H_{10}O_4$), na proporção de 3:1, e que a fração 2 (F2) é constituída pela furanocumarina isopimpinelina ($C_{13}H_{10}O_5$). O FS S137 foi sintetizado e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Mark Wainwright, da Liverpool John Moores University, UK. O isolamento das duas frações e a identificação dos seus constituintes foram feitos durante o presente trabalho. As fórmulas estruturais de todas as moléculas são mostradas nas Figuras 3 e 4. Os espectros de absorção dos FS são mostrados nas Figuras 5 e 6.

Foram preparadas soluções-estoque de MB, NMBN, TBO e S137 em salina tamponada com tampão fosfato (phosphate buffered saline, 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 duas semanas. As soluções de 8-MOP e as soluções das frações 1 e 2 foram preparadas nos dias em que os experimentos foram realizados.

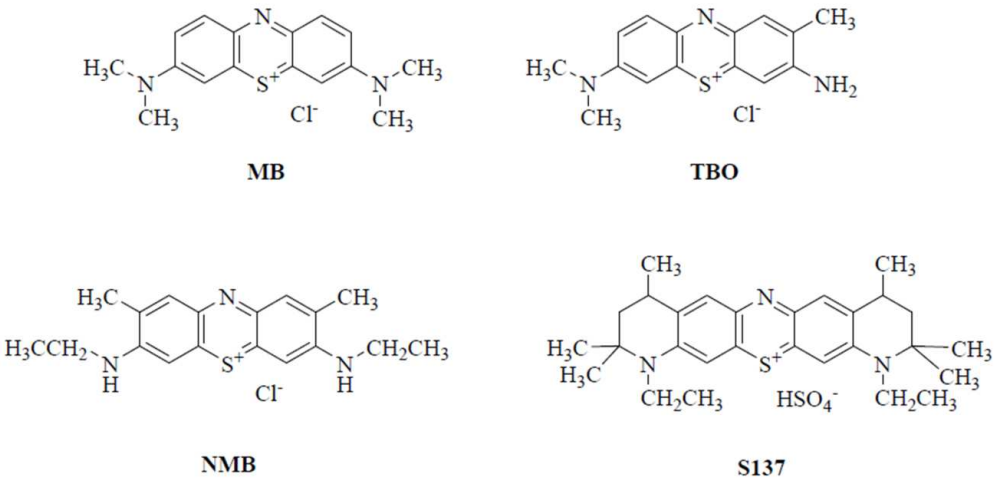


**Figura 3 –** Estrutura química dos FS fenotiazínicos uzados no estudo

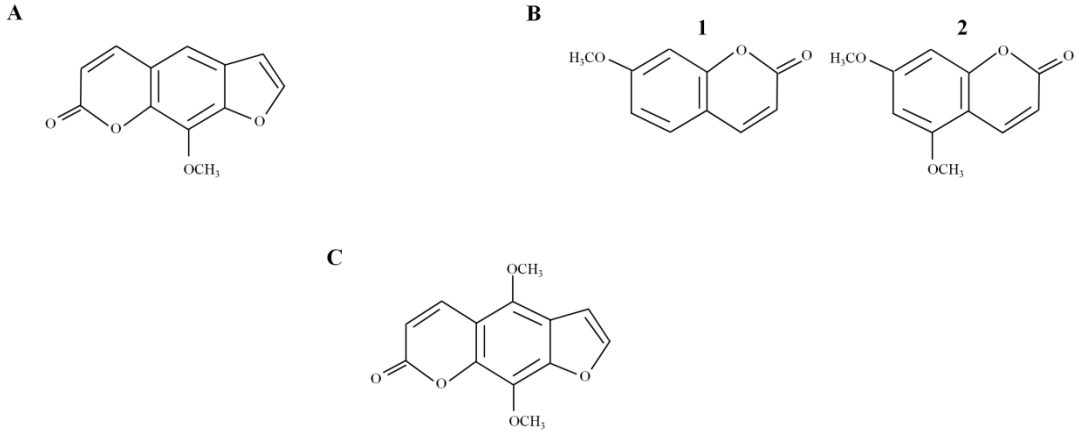


**Figura 4 –** Estrutura química dos FS furanocumarínicos e cumarínicos (A) 8-MOP, (B1) 7-metoxicumarin, (B2) 5,7-dimetoxicumarina e (C) isopimpinelina

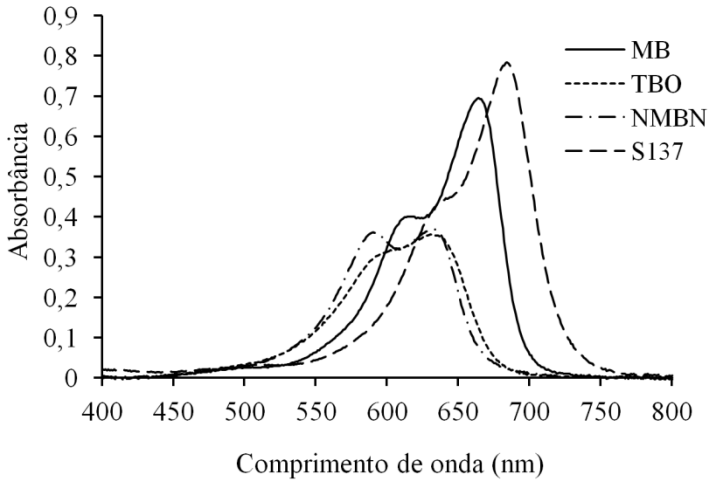


**Figura 5 –** Espectro de absorção no visível dos FS fenotiazínicos MB, TBO, NMBN e S137. Os espectros foram obtidos na concentração 10 µM

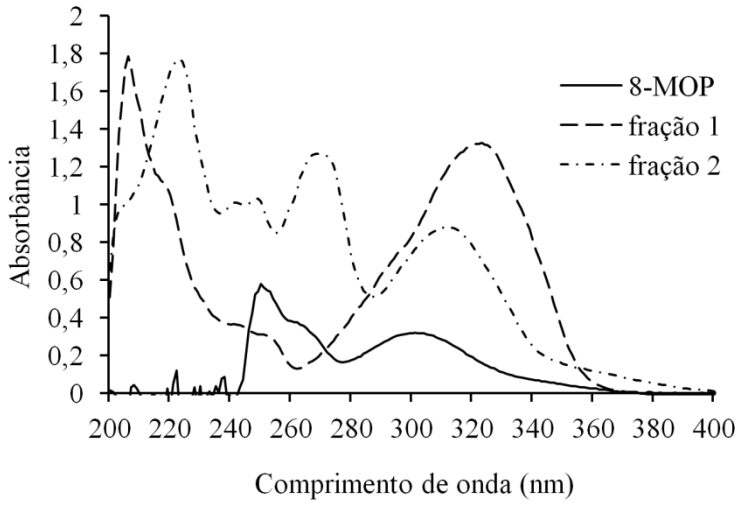


**Figura 6 –** Espectro de absorção no ultravioleta do 8-MOP, da fração 1 (7-metoxicumarina e 5,7-dimetoxicumarina) e da fração 2 (isopimpinelina). Os espectros foram obtidos na concentração 10 µM (8-MOP e isopimpinelina) e 1,25 mg $L^{-1}$ (fração 1)

### 3.3. Fontes artificiais de luz

Para a excitação dos FS fenotiazínicos, foram utilizados duas fontes de luz, um arranjo de 96 "light-emitting diodes" (LED) brancos, com espectro de emissão entre 400 e 700, um arranjo de 600 LED, (denominado LED600), com pico de emissão em 634 nm e irradiância de 9,2 mW $cm^{-2}$ (De PAULA et al., 2010). Para a excitação do 8-MOP, foram utilizadas duas lâmpadas fluorescentes F20T12/BL (Philips, Eindhoven, Holanda), com pico de emissão em 369 nm e irradiância de 1,0896 mW $cm^{-2}$. As lâmpadas foram montadas no interior de uma câmara com temperatura controlada (28°C) e circulação interna de ar (Nova Ética, SP, Brasil). No caso das exposições à radiação UVA, as amostras foram cobertas com um filme de diacetato de celulose com 0,13 mm de espessura (JVC Industries, Le Mirada, CA, EUA), que bloqueia radiações com comprimentos de onda menores que 290 nm. Todas as irradiâncias foram medidas com um espectroradiômetro USB 4000 (Ocean Optics, FL, EUA). Os espectros de emissão das fontes de luz utilizadas são mostrados na Figura 7.

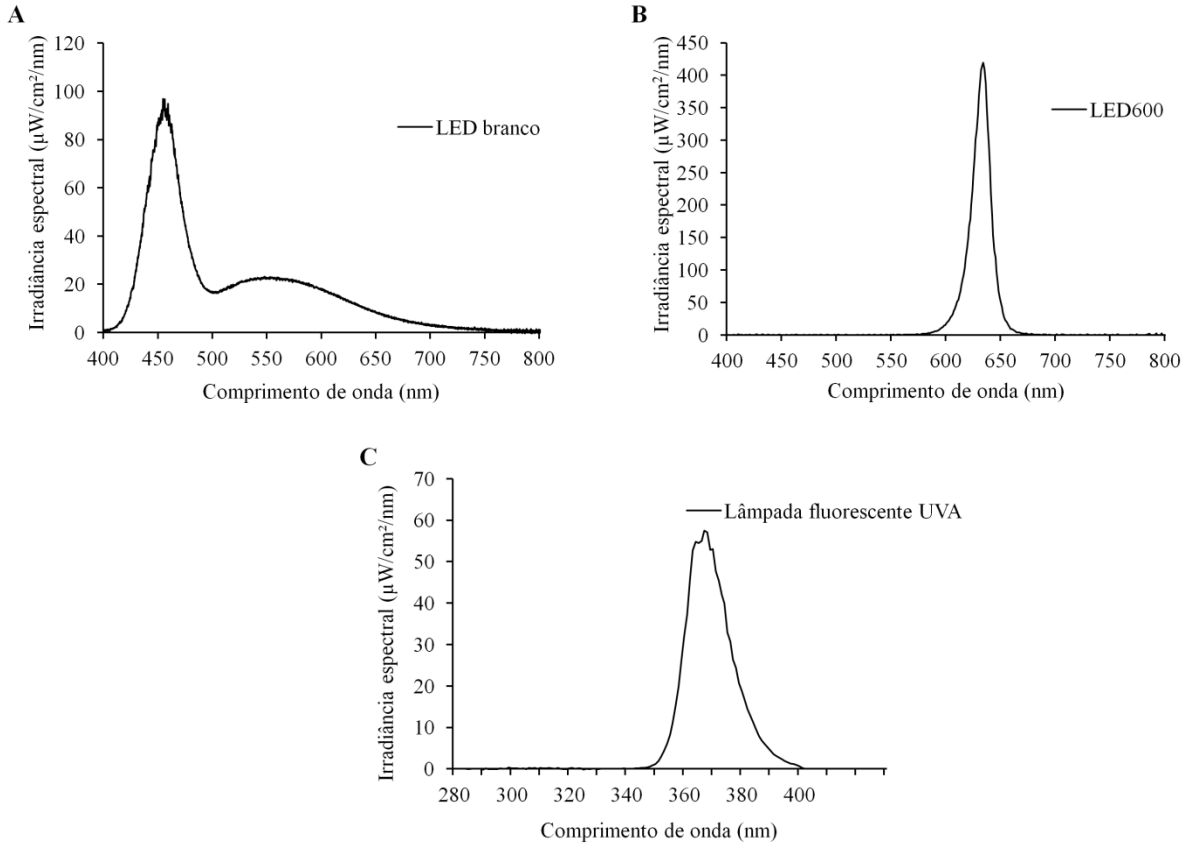


**Figura 7 –** Emissão espectral do (A) LED brancos, (B) LED600 e (C) das lâmpadas fluorescentes UVA

### 3.4. Determinação do potencial zeta dos conídios

A determinação do potencial zeta foi realizada em conídios das duas espécies de *Colletotrichum* e em conídios de *A. nidulans,* utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido). Os conídios foram suspensos em uma mistura de Tween 80 (0,01 % v/v) e PBS, pH 7,4, na concentração $5 \times 10^4$ células $mL^{-1}$.

### 3.5. Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico dos conídios com os FS fenotiazínicos pela da concentração fungicida mínima (CFM)

Em microplacas de 96 poços (TPP, Suiça), foram colocados 50 µL da suspensão de células e 50 µL dos FS em diferentes concentrações. A concentração final de células foi $4 \times 10^4$ células $mL^{-1}$. As concentrações finais dos FS, diluídos em PBS, nas misturas foram 1; 2,5;

5; 10; 12,5; 25; 50; 75; 100 e 200 µM para o MB, NMBN e TBO e 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 12,5; 25; 30; 40, 50 e 75 µM para o S137, respectivamente. As microplacas foram mantidas no escuro por 30 min (período de pré-incubação) e, a seguir, foram expostas à luz. As fontes de luz utilizadas foram o LED600 e o arranjo de LED brancos. Para o LED600, as doses finais foram 5, 10, 15, 20, 25 e 30 J $cm^{-2}$ (obtidas com 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos de exposição, respectrivamente) e, para o conjunto de LED brancos, as doses finais foram 5 e 10 J $cm^{-2}$ (obtidas com 30 e 60 mininutos de exposição, respectivamente). Microplacas-controle, que ficaram protegidas da luz durante as exposições, e células expostas à luz na ausência de FS foram preparadas em paralelo para todos os tratamentos. Após as exposições, 100 µL de meio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corporation, NY, EUA), com o dobro da concentração original, foram acrescentados aos poços. As microplacas foram incubadas no escuro, a 28°C, por até 96 h. O crescimento foi avaliado após 48, 72 e 96 h. Os poços, contendo as concentrações que inibiram completamente o crescimento do fungo, foram agitados e 10 µL foram transferidos para a superfície de meio PDAY, em placas de Petri. As placas foram incubadas a 28°C e o desenvolvimento foi avaliado por até 96 h, quando a CFM foi determinada.

### 3.6. Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico dos conídios com o FS 8-metoxipsoraleno pela concentração fungicida mínima (CFM)

Em microplacas de 96 poços (TPP, Suíça), foram colocados 50 µL da suspensão de células e 50 µL dos FS em diferentes concentrações. A concentração final de células foi $4 \times 10^4$ células $mL^{-1}$. As concentrações finais do 8-MOP nas misturas foram 25; 50; 75; 100 e 200 µM. A diluição do FS foi feita como descrito no protocolo M38-A do CLSI (2002) para o preparo de compostos insolúveis em água. As microplacas foram mantidas no escuro por 30 min (período de pré-incubação) e, a seguir, foram expostas às doses de 7,2, 9,9 e 11,8 J $cm^{-2}$

(2, 2,5 e 3 h de exposição, respectivamente). Microplacas controle ficaram protegidas da luz durante as exposições e células expostas à luz na ausência de FS foram preparadas em paralelo para todos os tratamentos. Após as exposições, 100 µL de meio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corporation, NY, EUA), com o dobro da concentração original, foram acrescentados aos poços. As microplacas foram incubadas no escuro, a 28°C, por até 96 h. O crescimento foi avaliado após 48, 72 e 96 h. Os poços, contendo as concentrações que inibiram completamente o crescimento do fungo, foram agitados e 50 µL foram transferidos e espalhados na superfície de meio PDAY, em placas de Petri. As placas foram incubadas a 28°C e o desenvolvimento foi avaliado por até 96 h, quando a CFM foi determinada.

## 3.7. Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico dos conídios pela fração de sobreviventes

### 3.7.1. Fenotiazínicos

Em microtubos de 1,5 mL (polipropileno, Axygen Scientific, CA, EUA), foram adicionados 500 µL de suspensão de conídios e 500 µL dos FS NMBN e S137. As concentrações finais nas misturas foram $2 \times 10^6$ conídios $mL^{-1}$ e 50 µM (NMBN) e 10 µM (S137) dos FS. Os microtubos foram mantidos no escuro por 30 min (pré-incubação). Posteriormente, as células foram divididas em dois grupos. As células do grupo 1 foram lavadas com Tween 80 (0,01% v/v) para a retirada do FS não ligado e as células do grupo 2 não foram lavadas. Para a lavagem, os conídios foram centrifugados 3 vezes a 5000 *g* por 5 min em Tween 80 (0,01% v/v). Em seguida, 200 µL de cada suspensão foram colocados em placas de 96 poços (poliestireno, TPP, Suíça) e as placas foram expostas à luz emitida pelo LED600 (doses de 15, 20 e 25 J $cm^{-2}$). Após as exposições, as suspensões foram agitadas e diluídas ($10^{-1}$ a $10^{-4}$) e 50 µL de cada diluição foram espalhados na superfície de 5 mL de PDAY, suplementado com 0,8 g $L^{-1}$ de ácido deoxicólico (sal sódico) (Fluka, Itália), em

placas de Petri (60 × 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 ×), e estendidas 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. O efeito das diferentes concentrações do FS foi estimado pela determinação da fração de sobreviventes, que foi calculada dividindo-se o número de colônias de um dado tratamento, denominado (n), pelo número de colônias do controle não tratado com FS e nem exposto à luz ($n_0$). Os conídios que não originaram colônias após 7 dias foram considerados mortos pelo tratamento.

### 3.7.2. Furanocumarinas e cumarinas

Em microplacas de 24 poços (poliestireno, TPP, Suíça), foram colocados 1000 µL de suspensão de conídios e 1000 µL de solução dos FS: (1) 8-MOP, (2) fração 1 (F1) e (3) fração 2 (F2). A concentração final de conídio nas misturas foi $2 \times 10^6$ conídios $mL^{-1}$. As concentrações finais dos FS foram 50 µM do 8-MOP e da isopimpinelina (F2) (as concentrações em g $L^{-1}$ do MOP e da isopimpinelina foram 10,8 mg $L^{-1}$ e 12,3 mg $L^{-1}$, respectivamente) e 25 µM (5,4 mg $L^{-1}$ e 6,15 mg $L^{-1}$, respectivamente). Para a F1, as concentrações finais foram 12,5 mg $L^{-1}$ e 6,25 mg $L^{-1}$. As microplacas foram mantidas no escuro por 30 min (pré-incubação). A seguir, células foram divididas em dois grupos. No grupo 1, as células foram lavadas com Tween 80 (0,01% v/v) para a retirada do FS não ligado às células (apenas para a maior concentração do FS utilizado). No grupo 2, as células não foram lavadas. Para a lavagem, os conídios foram centrifugados 3 × a 5000 *g*, por 5 min, em

Tween 80 (0,01% v/v). Em seguida, 2000 µL de cada suspensão foram colocados nas microplacas e expostos à radiação solar por 1 e 2 h. Os experimentos foram conduzidos entre as 11 e as 13 h dos dias 3 e 17/04 de 2012, em Ribeirão Preto, SP). As placas foram cobertas com filtro de diacetato de celulose durante as exposições. Após as exposições, as suspensões foram agitadas e diluídas ($10^{-1}$ a $10^{-4}$) e 50 µL de cada diluição foram espalhados na superfície de 5 mL de PDAY, suplementado com 0,8 g $L^{-1}$ de ácido deoxicólico (sal sódico) (Fluka, Itália), em placas de Petri (60 × 15 mm). 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 ×), e estendidas 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. O efeito das diferentes concentrações do FS foi estimado pela determinação da fração de sobreviventes. O efeito das exposições apenas à luz foi estimado pela determinação da fração de sobreviventes, que foi calculada dividindo-se o número de colônias de um dado tratamento pelo número de colônias do controle não tratado com FS e nem exposto à luz. O efeito dos TF foi calculado dividindo-se o número de colônias tratadas com o FS e expostas à luz pelo número de colônias das placas expostas apenas à luz. Os conídios que não originaram colônias após 7 dias foram considerados mortos pelo tratamento.

### 3.8. Determinação da localização subcelular dos FS nos conídios de *C. acutatum*

A microscopia óptica de campo claro foi utilizada para determinar a localização dos FS fenotiazínicos NMBN e S137 e do corante Sudan III 0,5 % m/v (Sigma, EUA), que possui afinidade por lipídios. A microscopia de fluorescência foi utilizada para determinar a localização do FS 8-MOP nos conídios de *C. acutatum*. Também foram utilizados os corantes

fluorescentes comerciais DAPI (Sigma, EUA) e FM®4-64 (Invitrogen, EUA), que coram DNA e estruturas membranosas como os vacúolos, respectivamente, para auxiliar a localização dos FS.

Nos experimentos com o 8-MOP, o DAPI e o FM®4-64, foram colocados 500 µL de suspensão de conídios ($2 \times 10^6$ conídios $mL^{-1}$) e 500 µL de solução dos corantes (100 µM, 3,5 mM e 8 µM para 8-MOP, DAPI e FM®4-64, respectivamente) em microtubos de 1,5 mL. Os tubos foram mantidos no escuro por 30 min e, a seguir, centrifugados (5000 *g*, 5 min). As células foram lavadas três vezes com PBS para a retirada do excesso do FS e dos corantes. A visualização dos conídios foi feita com o microscópio de fluorescência Leica DM5000 B (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) e objetiva de imersão em óleo (ampliação de 1000×).

### 3.9. Efeito da aplicação dos FS na superfície de folhas adultas de mudas de laranja pera (*Citrus sinensis*)

Mudas com aproximadamente 1,5 m de altura foram adquiridas em um viveiro de plantas na cidade de Ribeirão Preto, SP. As plantas foram mantidas ao ar livre com regime normal de luz. Para avaliar os efeitos da aplicação dos FS nas folhas da laranja, 5 µL de soluções dos FS MB, TBO, NMBN, S137 e 8-MOP, na concentração de 50 µM, e de soluções das frações isoladas da água da saída da concentradora [F1 (12,5 g $L^{-1}$) e F2 (50 µM)] foram colocados na superfície superior (adaxial) das folhas. Os experimentos foram conduzidos no mês de abril de 2012. As plantas foram avaliadas diariamente, por até 3 semanas, após o tratamento com os FS.

### 3.9.1 Estudos histológicos de folhas de laranja pera (*Citrus sinensis*) após tratamento com os FS fenotiazícos

A microscopia óptica de campo claro foi utilizada para verificar se ocorre a penetração dos FS fenotiazínicos MB, TBO, NMBN e S137, nas folhas adultas de laranja pera. Foram colocados 10 µL de solução dos FS (100 µM) na superfície adaxial da folha. As folhas foram mantidas sobre a bancada, a 24°C, por aproximadamente 1 hora, tempo suficiente secar os 10 µL do FS. A seguir, a folha foi cortada com o auxilio de um micrótomo (Robhe, Rolemberg & Bhering comércio e importação LTDA. Belo Horizonte, MG). A visualização dos cortes histológicos da folha foi feita com o microscópio Leica DM5000 B (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) e ampliação de 200×.

## 3.10. Extração de furanocumarinas e cumarinas de óleos essenciais, subprodutos e resíduos industriais do processamento do limão Tahiti (*Citrus latifolia*)

### 3.10.1. Determinação da melhor fonte para extração de furanocumarinas e cumarinas

Os óleos (óleo da casca e a fase oleosa da essência), os subprodutos (bagaço com casca e bagacilho) e os resíduos industriais (água da saída da concentradora e água da descarga da polidora) do processamento industrial do limão foram obtidos da empresa Citrosuco (Grupo Fisher, Matão, SP). O processamento do limão Tahiti ocorreu na safra de 2011. Para a extração de furanocumarinas e cumarinas dos dois resíduos aquosos (água da saída da concentradora e água da descarga da polidora), 50 mL da amostra foram basificados pela adição de solução de NaOH (Synth, Brasil) 5 M a pH 13. A seguir, a mistura foi particionada três vezes com 30 mL de acetato de etila (AcOEt) (Quemis - Hexis científica, Brasil) em funil de separação. A fase orgânica foi desprezada e a fase aquosa foi acidificada a pH 1 pela adição de solução de $H_2SO_4$ (Synth, Brasil) 5 M e particionada três vezes com 30 mL de AcOEt, em funil de separação. As frações orgânicas foram reunidas e concentradas a

vácuo. Para a extração de furanocumarinas e cumarinas dos dois produtos oleosos (óleo da casca e fase oleosa da essência), foram dissolvidos 5 mL dos óleos em 30 mL de AcOEt. A mistura foi transferida para funil de separação e particionada três vezes com 30 mL de solução hidroalcoólica de KOH (Synth, Brasil) (70% de solução de KOH 5 M e 30% (v/v) de etanol) (Quemis - Hexis científica, Brasil). A fase aquosa foi acidificada a pH 1 com $H_2SO_4$ 5 M e particionada três vezes com 30 mL de AcOEt. As frações orgânicas foram reunidas e concentradas a vácuo. Para a extração de furanocumarinas e cumarinas dos dois produtos sólidos, o bagaço com casca e o bagacilho foram secos em estufa a 50°C, durante 24 h, e, posteriormente, triturados em moinho de facas. Aproximadamente 5 g foram suspensos em 50 mL de AcOEt. A suspensão foi filtrada em papel de filtro (Qualit 80G) e o filtrado foi transferido para funil de separação e particionado três vezes com 30 mL de solução hidroalcoólica de KOH (Synth, Brasil). A fase aquosa foi acidificada a pH 1 com $H_2SO_4$ 5 M e particionada três vezes com 30 mL de AcOEt. As frações orgânicas foram reunidas e concentradas a vácuo. Para detecção das furanocumarinas e cumarinas presentes, submeteram-se as amostras à cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) em placas de alumínio com fase estacionária de sílica gel 60 $F_{254}$ 20 × 20 cm (Merck, Alemanha). Para a eluição foi utilizada como fase móvel hexano/AcOEt (Quemis - Hexis científica, Brasil), na proporção de 7:3. A revelação das placas cromatograficas foi realizada com radiação ultravioleta a 254 nm e 366 nm. Em seguida, utilizou-se como revelador químico uma solução hidroalcoólica de KOH 1 M. Essas avaliações iniciais foram importantes para determinar quais produtos, subprodutos e resíduos do processamento do limão contem furanocumarinas e/ou cumarinas. Foi observado que o óleo da casca e a água da saída da concentradora apresentaram, em CCDC, maior quantidade dessas substâncias. A água da saída da concentradora foi escolhida como fonte para a obtenção de furanocumarinas e/ou cumarinas. Ao contrário do óleo da casca, que possui alto valor comercial por ser utilizado

pelas indústrias de cosméticos e alimentícia, a água de saída da concentradora é um resíduo industrial sem nenhum valor comercial.

### 3.10.2. Extração de furanocumarinas e cumarinas da água da saída da concentradora

2100 mL da água da saída da concentradora foram basificados pela adição de solução de NaOH 5 M a pH 13. A seguir, a mistura foi particionada três vezes com 1300 mL de AcOEt, em funil de separação. A fase orgânica foi desprezada e a fase aquosa foi acidificada a pH 1 pela adição de solução de $H_2SO_4$ 5 M e particionada três vezes com 1300 mL de AcOEt, em funil de separação. As frações orgânicas foram reunidas e concentradas a vácuo. Para a detecção e separação das furanocumarinas e cumarinas, submeteram-se os produtos das partições à cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), em placas de alumínio com fase estacionária de sílica gel 60 $F_{254}$ 20 × 20 cm (Merck, Alemanha). Para a eluição, utilizou-se como fase móvel hexano/AcOEt (Quemis - Hexis científica, Brasil) na proporção de 7:3. A revelação das placas foi realizada com radiação ultravioleta a 254 nm e 366 nm e, em seguida, utilizou-se como revelador químico uma solução hidroalcoólica de KOH 1 M.

Para a separação das furanocumarinas e cumarinas, utilizaram-se 7,85 g do extrato da água de saída da concentradora e, como técnica cromatográfica, a cromatografia líquida clássica (CLC), sendo a fase estacionária sílica gel (0,060 × 0,200 mm, 60 A, Merck, Alemanha) e a fase móvel hexano/AcOEt, em gradiente crescente de polaridade, como mostra a Tabela 1. Ao final do processo, foi utilizado metanol (Quemis - Hexis científica) para a retirada dos resíduos retidos na fase estacionária.

**Tabela 1 –** Frações da água de saída da concentradora obtidas por cromatografia líquida clássica (CLC)

| Frações | Proporção da fase móvel | Volume | Massa |
|---|---|---|---|
| 1 | 100:0 | 1500 mL | 0,06 g |
| 2 | 95:5 | 1500 mL | 0,05 g |
| 3 | 90:10 | 1500 mL | 0,02 g |
| 4 | 85:15 | 1500 mL | 0,39 g |
| 5 | 85:15 | 1500 mL | 0,01 g |
| 6 | 75:25 | 1500 mL | 0,06 g |
| 7 | 70:30 | 1500 mL | 0,30 g |
| 8 | 65:35 | 1500 mL | 0,09 g |
| 9 | 0:100 | 4000 mL | 1,20 g |
| 10 | Metanol | 1000 mL | 5,24 g |
| 11 | Metanol | 1000 mL | 0,08 g |

Cada fração foi concentrada a vácuo e submetida à CCDC, em placas de alumínio, com fase estacionária de sílica gel 60 $F_{254}$ 20 × 20 cm (Merck, Alemanha) e como fase móvel hexano/AcOEt (Quemis - Hexis científica, Brasil), na proporção de 7:3. A revelação dos cromatogramas foi feita com radiação ultravioleta a 254 nm e 366 nm e, em seguida, utilizou-se como revelador químico uma solução hidroalcoólica de KOH 1 M. Nas frações 3 e 4 da CLC, foram observadas fluorescências características de furanocumarinas e cumarinas. Essas frações foram submetidas a outros processos de separação.

A fração 3 da CLC foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). Em duas placas preparativas de sílica gel 60 $PF_{254}$ (Merck, Alemanha), foram aplicados 10 mg da fração. Em seguida, as placas foram colocadas em cuba de vidro saturada com a fase móvel hexano/acetona, na proporção de 8:2. Após a eluição, as placas foram retiradas, secas à temperatura ambiente e observadas sob radiação UV a 254 nm e 366 nm. As

frações visíveis e bem definidas, quando observadas no comprimento de onda curto (254 nm), foram recolhidas, suspensas em AcOEt, filtradas e os solventes foram evaporados a vácuo. Foram obtidas duas frações (Tabela 2). Apenas a fração 2, por apresentar fluorescência típica de furanocumarinas, foi analisada por RMN.

**Tabela 2 –** Frações obtidas por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), a partir da fração 3 da CLC

| Frações | Hexano/Acetona | Peso |
|---|---|---|
| 1 | 80:20 | 0,002 g |
| 2 | 80:20 | 0,012 g |

Outra fração da CLC estudada foi a fração 4, que foi submetida a outra purificação, utilizando-se CLC. Foram utilizados 390 mg dessa fração. Como fase estacionária, foi utilizada sílica gel (060 × 0,200 mm, 60 A, Merck, Alemanha) e, como fase móvel, hexano/AcOEt, com gradiente de polaridade 96:4. Foram obtidas 3 frações (Tabela 3). As duas frações majoritárias [fração 1 (F1) e fração 2 (F2)] foram analisadas por RMN.

**Tabela 3 –** Frações obtidas por cromatografia líquida clássica (CLC), a partir da fração 4 da CLC

| Frações | Hexano/Acetona | Peso |
|---|---|---|
| 1 | 96:4 | 0,13 g |
| 2 | 96:4 | 0,12 g |
| 3 | 96:4 | 0,03 g |

**3.11. Elucidação das estruturas das substancias extraídas**

A estrutura química da furanocumarina e das cumarinas majoritárias foram propostas por meio de análises com as seguintes técnicas espectroscópicas: ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^{1}$H, 300 MHz, 400 MHz e 500 MHz) e de carbono-13 (RMN $^{13}$C, 300 MHz e 400 MHz), HMQC (*Heteronuclear multiple quantum coherence*, $^{1}$H - $^{13}$C, 300 MHz/ $^{1}$H, 400 MHz/ $^{13}$C) e HMBC (*Heteronuclear multiple bond coherence*, $^{1}$H - $^{13}$C, 300 MHz/ $^{1}$H, 400 MHz/ $^{13}$C). Os espectros de RMN foram obtidos em clorofórmio deuterado (Merck, Alemanha), utilizando-se o equipamento Bruker DPX 400 para a obtenção dos espectros. As análises foram feitas no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP (FFCLRP-USP).

A identificação dos constituintes químicos foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando-se o equipamento Shimadzu QP2010Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), acoplado ao injetor automático AOC-20i, fonte de ionização por elétrons (EI-EM) e analisador quadrupolar. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio grau HPLC (Mallinckrodt, USA) e submetidas à extração em fase sólida (*clean up*), em cartuchos Supelco DSI-70PK/54 500 mg, e, posteriormente, analisadas por CG-EM. Foi utilizada coluna capilar Rtx-5MS (Restek, USA) de sílica fundida (30 m × 0,25 mm d. i. × 0,25 μm de filme), composta de 5% de difenilsiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano e hélio (99,999%) como gás de arraste com fluxo constante de 1,1 mL min$^{-1}$. A temperatura do injetor foi de 250°C e o volume de injeção foi de 0,1 μL. A temperatura do forno foi programada de 100°C a 290°C, a uma velocidade de 3°C min$^{-1}$, mantendo-se em 290°C, durante 30 min. As amostras eluídas da coluna cromatográfica foram direcionadas pelo divisor de fluxo para a fonte de ionização, na razão de 1:10. As temperaturas da fonte e da interface foram ajustadas em 250°C e 280°C, respectivamente. A energia do feixe de elétrons foi de 70 eV. O analisador foi controlado para separar íons de *m/z* entre 40 e 500. Os

espectros de massas obtidos foram comparados com os das Bibliotecas Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 com o software GCMS Solution (Shimadzu, Japão), que forneceu o índice de similaridade (IS), expresso em porcentagem.

### 3.12. Estudo de espectroscopia de absorção no UV e no visível e espectroscopia de emissão de fluorescência das furanocumarinas e cumarinas extraídas do limão Tahiti

Para que a execução dos experimentos de fotossensibilização é fundamental conhecer algumas propriedades físico-químicas das furanocumarinas e cumarinas extraídas, como os espectros de absorção e de fluorescência. Foram feitas medidas de espectroscopia de absorção, utilizando-se o espectrofotômetro Amersham Ultraspec™ 2100 pro UV-visible (GE Healthcare, Alemanha), de feixe simples, que permite medidas no intervalo entre 190 e 900 nm, com largura de banda de 3 nm. Em seguida, foram determinados os espectros de emissão de fluorescência. As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro Hitachi F-7000 Fluorescence Spectrophotometer (Hitachi, Japão), com uma lâmpada de xenônio de 150 W como fonte de luz, que varre o intervalo de comprimento de onda de exitação entre 200 e 750 nm. A captação da emissão de fluorescencia foi feita no intervalo de 200 e 900 nm. Todas as análises espectroscópicas foram feitas no laboratório de fotobiofísica do Prof. Dr. Amando Siuiti Ito, do departamento de Física e Matemática da FFCLRP-USP.

## II. Fotobiologia de *Colletotrichum acutatum*

### 3.13. Linhagens utilizadas e condições de crescimento

Os experimentos foram realizados com as linhagens CA 1209, CA MG-1, CA T-2, CA P-4 e CA B-3 de *C. acutatum*, ATCC 10074 de *Aspergillus nidulans* e ARSEF 324 de *Metarhizium acridum*. As linhagens CA MG-1, CA T-2, CA P-4 e CA B-3 de *C. acutatum* foram respectivamente isoladas nas seguintes cidades do estado de São Paulo: Mogi-Guaçú, Taquarituba, Barretos e Pedranópolis. As linhagens foram gentilmente cedidas pelo Dr. Geraldo José Silva Junior, do Fundecitrus (Araraquara, SP). A linhagem de *A. nidulans* foi adquirida da "American Type Culture Collection" (ATCC) (Manassas, VA, EUA) e a linhagem de *M. acridum* foi adquirida do "United States Department of Agriculture (USDA)-Agricultural Research Service (ARS) Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures (ARSEF) (U.S. Plant, Soil and Nutrition Laboratory, Ithaca, NY)". Todas as espécies foram crescidas em meio PDAY a 28°C, por 5 dias (*C. acutatum* e *A. nidulans*) e 12 dias (*M. acridum*), no escuro, ou com fotoperíodo de 12 h (claro / escuro). A iluminação foi fornecida por duas lâmpadas fluorescentes Daylight Plus F30W/155-T8 (Sylvania, Germany). Após o crescimento, os conídios foram cuidadosamente removidos e suspensos em solução 0,01% (v/v) de Tween 80 e a concentração da suspensão foi determinada por contagens em hematímetro.

### 3.14. Câmara de irradiação UV, lâmpadas e filtro

As exposições à radiação UVB foram realizadas em câmara com temperatura controlada e circulação interna de ar (Nova Ética, SP, Brasil) a 28°C. A radiação UVB foi fornecida por duas lâmpadas fluorescentes TL-20W/12 RS (Philips, Eindhoven, Holanda), com pico de emissão em 313 nm. Durante as exposições, as amostras foram cobertas com um filme de diacetato de celulose com 0,13 mm de espessura (JVC Industries, Le Mirada, CA,

EUA), que bloqueia radiações com comprimentos de onda menores que 290 nm. A irradiância foi medida com um espectroradiômetro USB4000 (Ocean Optics, Dunedin, FL). A distribuição espectral das lâmpadas, filtrada pelo diacetato, foi mostrada por Braga e colaboradores (2001b). O espectro de ação de dano ao DNA, descrito por Quaite e colaboradores (1992), normalizado para a unidade a 300 nm, foi utilizado para calcular a irradiância de UVB em mW $m^{-2}$. Esse espectro de ação foi selecionado porque Paul e colaboradores (1997) compararam os espectros de ação mais utilizados em relação às respostas de diversas espécies de fungos à radiação UV e concluíram que o espectro de Quaite foi o que apresentou a melhor concordância. Uma discussão mais profunda a esse respeito pode ser vista em Braga e colaboradores (2001b).

### 3.15. Avaliação da tolerância à radiação UVB dos conídios de *C. acutatum*

O objetivo desse experimento foi comparar a tolerância à radiação UVB de conídios de 5 linhagens de *C. acutatum*. As linhagens CA 1209, CA MG-1, CA T-2, CA B-3 e CA P-4 cresceram por 5 dias em completa escuridão. Os conídios (50 µL, $2 \times 10^4$ conídios $mL^{-1}$, nas exposições de 1 e 2 h; 50 µL, $4 \times 10^4$ conídios $mL^{-1}$, nas exposições de 3 e 4 h e 50 µL, $2 \times 10^5$ conídios $mL^{-1}$, nas exposições de 6 h) foram espalhados na superfície de 6 mL de PDAY, suplementado com 0,8 g $L^{-1}$ de ácido desoxicólico (sal sódico), em placas de Petri (6 cm de diâmetro). Após a inoculação, os conídios foram imediatamente expostos à irradiância de 1800 mW $m^{-2}$ de UVB, por 1, 2, 3, 4 e 6 h. As doses, ao final das exposições, foram 6,5, 13, 19,4, 25,9 e 38,9 kJ $m^{-2}$, respectivamente. Quatro placas-réplica foram irradiadas para cada período de exposição. Placas-controle foram envoltas em papel alumínio e protegidas da radiação no interior da câmara. Após a exposição, as placas foram incubadas a 28°C, no escuro. A contagem das colônias iniciou-se após 24 h, com auxílio de estereomicroscópio (ampliação de 8 ×) e estendeu-se até 7 dias. A sobrevivência relativa foi calculada,

comparando-se o número de colônias nas placas expostas à radiação UV com o número de colônias nas placas-controle não expostas.

### 3.16. Efeito da exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *C. acutatum* na produção de conídios e de mucilagem

O objetivo foi comparar a produção de conídios e de mucilagem por colônias crescidas no escuro com a produção por colônias crescidas com fotoperíodo claro/escuro. As colônias desenvolveram-se por cinco dias em completa escuridão ou com fotoperíodo de 12 h de claro e 12 h de escuro. Após o crescimento, foram retirados, de cada placa, quatro cilindros com 0,5 $cm^2$ de área superficial. Os cilindros foram colocados em 5 mL de Tween 80 (0,01% v/v) e os tubos foram agitados por 1 min. A seguir, a mistura foi filtrada em gaze. O filtrado foi diluído dez vezes e a concentração de conídios determinada com auxílio de hematímetro. A quantidade de mucilagem foi estimada pelo espectro de absorção da solução. Os conídios foram removidos por centrifugação e o espectro de absorção da suspensão diluída (1:10) foi determinado em espectrofotômetro Ultrospec™ 2100 pro UV-visible (GE Healthcare).

### 3.17. Efeito da exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *C. acutatum* na tolerância à radiação UVB dos conídios produzidos

O objetivo foi comparar a tolerância à radiação UVB de conídios produzidos por colônias que desenvolveram-se por cinco dias em completa escuridão com a tolerância de conídios produzidos por colônias que cresceram por cinco dias, com fotoperíodo de 12 h de claro e 12 h de escuro. Foram avaliadas as linhagens CA T-2 e CA B-3 de *C. acutatum*. Os conídios (50 µL, $2 \times 10^4$ conídios $mL^{-1}$) foram espalhados na superfície de 6 mL de PDAY, em placas de Petri (6 cm de diâmetro), e imediatamente expostos à irradiância de 1800 mW $m^{-2}$ de UV, por 2 e 3 h (doses de 13 e 19,4 kJ $m^{-2}$, respectivamente). Quatro placas-réplica

foram irradiadas para cada período de exposição. Placas-controle foram embrulhadas em papel alumínio e protegidas da radiação no interior da câmara. Após a exposição, as placas foram incubadas a 28°C, no escuro, e a contagem das colônias iniciou-se após 24 h, com auxílio de estereomicroscópio (ampliação de 8 ×), e estendeu-se até 7 dias. A sobrevivência relativa foi calculada, comparando-se o número de colônias nas placas expostas à radiação UV com o número de colônias nas placas não expostas. Foram realizados três experimentos independentes.

### 3.18. Efeito da exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *C. acutatum*, *M. acridum* e *A. nidulans* na tolerância à radiação UVB dos conídios produzidos

O objetivo foi comparar o efeito de exposição à luz visível durante o desenvolvimento na tolerância à radiação UVB de conídios de três espécies que apresentam diferentes nichos ecológicos. Os experimentos foram realizados com as linhagens CA T-2 de *C. acutatum*, ARSEF 324 de *M. acridum* e ATCC 10074 de *A. nidulans*. Os conídios (50 µL, $2 \times 10^4$ conídios $mL^{-1}$) foram espalhados na superfície de 6 mL de PDAY, em placas de Petri (6 cm de diâmetro) e imediatamente expostos à irradiância de 1800 mW $m^{-2}$ de UV, por 1, 2 e 3 h (doses de 6,5, 13 e 19,4 kJ $m^{-2}$, respectivamente). Quatro placas-réplica foram irradiadas para cada período de exposição. Placas-controle foram embrulhadas em papel alumínio e protegidas da radiação no interior da câmara. Após a exposição, as placas foram incubadas a 28°C, no escuro, e a contagem das colônias iniciou-se após 24 h, com auxílio de estereomicroscópio (ampliação de 8 ×), e estendeu-se até 7 dias. A sobrevivência relativa foi calculada, comparando-se o número de colônias nas placas expostas a cada dose de radiação com o número de colônias nas placas-controle não expostas.

**3.19. Exposições de colônias esporuladas de *C. acutatum* à radiação UVB e avaliação da sobrevivência dos conídios**

O objetivo foi avaliar a tolerância à radiação UVB dos conídios quando envoltos pela mucilagem. Placas da linhagem CA T-2 de *C. acutatum* foram crescidas por cinco dias em completa escuridão e crescidas com fotoperíodo de 12 h de claro e 12 h de escuro. As placas foram expostas à irradiância de 1800 mW $m^{-2}$ de UVB, por 0, 3, 5, 7 e 9 h (doses de 19,4, 32,4, 45,4 e 58,3 kJ $m^{-2}$, respectivamente). Após cada período de exposição, uma amostra de conídios foi removida, os conídios foram suspensos em solução 0,01% de Tween 80 e a concentração da suspensão foi ajustada para $2 \times 10^4$ conídios $mL^{-1}$. A seguir, 50 µL da solução foram espalhados na superfície de 6 mL de PDAY, em cada uma das quatro placas-réplica (6 cm de diâmetro). As placas foram incubadas a 28°C, no escuro, e a contagem das colônias iniciou-se após 24 h, com auxílio de estereomicroscópio (ampliação de 8 ×), e estendeu-se até 7 dias. A sobrevivência relativa foi calculada, comparando-se o número de colônias nas placas inoculadas com os conídios expostos à radiação com o número de colônias nas placas inoculadas com conídios não expostos (0 h).

**3.20 Análise estatística**

Inicialmente, foi feita uma análise exploratória dos dados de todos os experimentos, com a determinação de medidas de posição central e de dispersão. A seguir, os dados foram submetidos à análise de variância. As comparações entre os tratamentos foram feitas, utilizando-se contrastes ortogonais (MONTGOMERY, 2001). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. As análises foram feitas, utilizando-se o PROC GLM do programa SAS 9.0 (SAS Institute Inc., *SAS/STAT® User's Guide, Version 9.0*, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2003).

# 4. RESULTADOS

## I. Inativação fotodinâmica de conídios

### 4.1. Determinação do potencial zeta dos conídios

A Tabela 4 mostra o potencial zeta dos conídios de *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* e *A. nidulans*. Em todos os casos, as células foram suspensas em uma mistura de Tween 80 (0,01 % v/v) e PBS, pH 7,4. O potencial zeta dos conídios de todas as espécies foi negativo e variou entre -11,1 e -15,6 mV.

**Tabela 4 –** Potencial zeta dos conídios de *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporiodes* e *A. nidulans*

| Diluente/Espécies | Potencial zeta (mV) |
|---|---|
| Tween 80 + PBS | -9,37 |
| *C. acutatum* CA 1209 | -15,6 |
| *C. gloeosporioides* CG 1 | -12,9 |
| *A. nidulans* ATCC 10074 | -11,2 |

### 4.2. Avaliação da eficácia do TF dos conídios pela CFM

#### 4.2.1. Efeito das exposições apenas à luz e apenas aos FS na sobrevivência dos conídios

Exposições apenas à luz, utilizando as fontes artificiais LED brancos, LED600 e lâmpadas UVA, independentemente da dose utilizada, não foram fungistáticas ou fungicidas para nenhuma das espécies avaliadas (dados não mostrados). Na ausência de luz, o MB, o TBO, o NMBN e o 8-MOP não apresentaram atividade fungistática ou fungicida em nenhuma das concentrações testadas (1 a 200 µM). O S137 foi o único FS que apresentou toxicidade no escuro, sendo tanto fungistático como fungicida, na concentração de 75 µM para *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *A. nidulans* (Tabela 5).

**Tabela 5 –** Concentração fungicida mínima (µM) dos FS MB, TBO, NMBN, S137 e 8-MOP, na ausência de luz, para os conídios de *Colletotrichum acutatum, C. gloeosporioides* e de *A. nidulans*

| Espécies/FS | MB | TBO | NMBN | S137 | 8-MOP |
|---|---|---|---|---|---|
| *C. acutatum* CA 1209 | >200 | >200 | >200 | 75 | >200 |
| *C. gloeosporioides* CG 1 | >200 | >200 | >200 | 75 | >200 |
| *A. nidulans* ATCC 10074 | >200 | >200 | >200 | 75 | >200 |

**4.2.2. Efeito das exposições simultâneas à luz e aos FS fenotiazínicos na sobrevivência dos conídios**

***(A) LED brancos.*** A Tabela 6 mostra a CFM dos tratamentos fotodinâmicos com os diferentes FS para as duas espécies de *Colletotrichum* e *A. nidulans*. Os conídios de *C. acutatum, C. gloeosporioides* e *A. nidulans* foram pré-incubados, por 30 min, com os FS MB, TBO e NMBN e, a seguir, expostos à luz emitida pelos LED brancos (doses de 5 e 10 J $cm^{-2}$). Como a maior concentração testada dos FS foi 200 µM, resultados >200 µM indicam que não foi observada inativação fotodinâmica em nenhuma das concentrações avaliadas. Nenhum dos três FS fotoinativou os conídios de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* quando foi utilizada a menor dose de luz (5 J $cm^{-2}$). Nessa dose, *A. nidulans* foi fotoinativado pelo MB e pelo TBO (CFM de 200 e 100 µM, respectivamente), mas não pelo NMBN (Tabela 6). Quando a dose de 10 J $cm^{-2}$ foi utilizada, o MB foi fungicida para *C. acutatum* (intervalo da CFM: 100-200 µM) e para *A. nidulans* (intervalo da CFM: 50-75 µM), mas não para *C. gloeosporioides* (CFM > 200). O TBO foi fungicida apenas para *A. nidulans* (intervalo da CFM: 50-75 µM). O NMBN fotoinativou os conídios das três espécies (intervalos da CFM: 50-100, 75-100 e 75-100 µM para *C. acutatum, C. gloeosporioides* e *A. nidulans*, respectivamente) (Tabela 6).

**Tabela 6 –** CFM (µM) dos FS MB, TBO e NMBN para a IF dos conídios de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *A. nidulans*, utilizando-se LED brancos como fonte de luz e doses de 5 e 10 J $cm^{-2}$. A CFM é expressa como intervalo das CFM observado em três experimentos independentes

| Espécies | 5 J $cm^{-2}$ | | | 10 J $cm^{-2}$ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | MB | TBO | NMBN | MB | TBO | NMBN |
| *C. acutatum* | >200 | >200 | >200 | 100-200 | >200 | 50-100 |
| *C. gloeosporioides* | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 75-100 |
| *A. nidulans* | 200 | 100 | >200 | 50-75 | 50-75 | 75-100 |

***(B) LED600.*** A Tabela 7 mostra a CFM dos tratamentos fotodinâmicos com os diferentes FS, utilizando-se o LED600 como fonte de luz e doses de 5 a 30 J $cm^{-2}$. De maneira geral, quanto maior a dose de luz utilizada, menor a CFM requerida para a matar os conídios. O FS mais eficaz (que apresentou a menor CFM para uma determinada dose de luz), para todas as espécies estudadas, foi o S137, seguido do NMBN e do TBO, para as duas espécies de *Colletotrichum* e do TBO e do NMBN para *A. nidulans* (Tabela 7). O FS menos eficaz para as três espécies foi o MB (Tabela 7). Concentrações entre 5 e 12,5 µM de S137 e dose final de luz de 15 J $cm^{-2}$ foram capazes de fotoinativar os conídios de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *A. nidulans*. Os conídios dos fitopatógenos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* foram muito mais tolerantes ao tratamento fotodinâmico com os FS MB, TBO e NMBN em relação aos conídios de *A.nidulans* (Tabela 7).

**Tabela 7 –** CFM (µM) dos FS MB, TBO, NMBN e S137 para a IF dos conídios de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *A. nidulans*, utilizando-se o LED600 como fontes de luz e doses de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 J cm$^{-2}$. A CFM é expressa como intervalo das CFM observado em três experimentos independentes

| | **FS/Dose** | **0** | **5 J cm$^{-2}$** | **10 J cm$^{-2}$** | **15 J cm$^{-2}$** | **20 J cm$^{-2}$** | **25 J cm$^{-2}$** | **30 J cm$^{-2}$** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***C. acutatum*** | MB | >200 | 200 | 200 | 100-200 | 75-200 | 100-200 | 50-200 |
| | TBO | >200 | 200 | 200 | 50-100 | 75-100 | 75-100 | 12,5-75 |
| | NMBN | >200 | 100 | 75 | 50 | 25-50 | 25-50 | 10-50 |
| | S137 | 75 | 25 | 10-12,5 | 5-12,5 | 5-10 | 5 | 5 |
| ***C. gloeosporioides*** | MB | >200 | >200 | 200 | 200 | 100-200 | 100-200 | 75-200 |
| | TBO | >200 | >200 | 200 | 50-150 | 50-100 | 75-100 | 12,5-75 |
| | NMBN | >200 | 200 | 75-100 | 50 | 25-75 | 12,5-75 | 10-50 |
| | S137 | 75 | 12,5-50 | 5-12,5 | 5-12,5 | 5-10 | 5 | 5 |
| ***A. nidulans*** | MB | >200 | 75-200 | 50-200 | 75 | 75 | 75-100 | 50-100 |
| | TBO | >200 | 75 | 25-75 | 25-75 | 10-25 | 10-25 | 5-12,5 |
| | NMBN | >200 | 50-100 | 50 | 50 | 25-50 | 25-75 | 12,5-25 |
| | S137 | 75 | 25 | 10-12,5 | 5-12,5 | 5-10 | 5 | 5 |

### 4.2.3. Efeito das exposições simultâneas à luz e ao 8-metoxipsoraleno na sobrevivência dos conídios

A Tabela 8 mostra a CFM dos tratamentos fotodinâmicos com o FS 8-metoxipsoraleno. Os conídios das quatro espécies foram pré-incubados, por 30 min, com o 8-metoxipsoraleno e, a seguir, expostos à luz emitida por duas lâmpadas fluorescentes UVA (doses de 7,2, 9,9 e 11,8 J $cm^{-2}$, obtidas ao final de 2, 2,5 e 3 h de exposição, respectivamente). Quanto maior a dose de luz, menor foi a CFM necessária para matar os conídios. As CFM (µM) do FS são mostradas na Tabela 8. Os conídios de *C. acutatum* foram os mais resistentes à IF; os intervalos das CFM foram 100-200, 75-100 e 75-100 µM para as dose de luz de 7,2, 9,9 e 11,8 J $cm^{-2}$, respectivamente. Para *C. gloeosporioides* e *A. nidulans,* os intervalos das CFM para a dose de luz de 7,2 J $cm^{-2}$ foram 75, 50-75 e 75 µM, respectivamente. Quando a dose de 11,8 J $cm^{-2}$ foi utilizada, a CFM para as duas espécies foi de 25 µM (Tabela 8). *C. gloeosporioides* e *A. nidulans* foram mais sensíveis do que *C. acutatum*.

**Tabela 8 –** Intervalo da CFM (µM) do FS 8-metoxipsoraleno para os conídios de *C. acutatum, C. gloeosporioides* e *A. nidulans,* utilizando-se duas lâmpadas fluorescentes UVA como fontes e doses final de luz de 7,2, 9,9 e 11,8 J $cm^{-2}$

| | **Dose** | | |
|---|---|---|---|
| **Espécies** | **7,2 J $cm^{-2}$** | **9,9 J $cm^{-2}$** | **11,8 J $cm^{-2}$** |
| *C. acutatum* | 100-200 | 75-100 | 75-100 |
| *C. gloeosporioides* | 75 | 50 | 25 |
| *A. nidulans* | 50-75 | 25-50 | 25 |

## 4.3. Avaliação da eficácia do TF dos conídios pela fração de sobreviventes

### 4.3.1. Fenotiazínicos

A realização de experimentos iniciais em microplacas, nos quais o efeito do tratamento fotodinâmico foi avaliado pela CIM e pela CFM, mostrou-se muito conveniente, pois permitiu a avaliação de um grande número de tratamentos. Foram avaliados os efeitos dos diversos FS, em várias concentrações, utilizando-se diferentes fontes de luz, com várias doses por fonte, em conídios de três espécies de fitopatógenos e do fungo-modelo *A. nidulans*. Esse tipo de experimento é mais rápido e barato e tem uma execução mais fácil do que os experimentos baseados na contagem das unidades formadoras de colônia. Dessa maneira, na etapa inicial, foram identificados os parâmetros (por exemplo, tipo de FS, concentração do FS e dose de luz) mais eficazes para a IF dos conídios das diferentes espécies. Esses parâmetros foram utilizados nos experimentos subsequentes, nos quais a IF (sobrevivência) dos conídios foi avaliada, de maneira mais precisa e detalhada, pela determinação das UFC.

A Figura 8 mostra o efeito do TF com o NMBN e o S137 na sobrevivência dos conídios de *C. acutatum* (6A e B), *C. gloeosporioides* (6C e D) e *A. nidulans* (6 E e F). Os conídios foram pré-incubados por 30 min, com o FS NMBN (50 µM) e S137 (10 µM), e lavados ou não com Tween 80 (0,01% v/v) antes de serem expostos às doses de 0, 15, 20 e 25 J $cm^{-2}$, utilizando-se o LED600 como fonte de luz. A contagem das UFC estendeu-se por 7 dias. A fração de sobrevivência dos diferentes tratamentos foi calculada em relação aos controles não expostos à luz e nem ao FS. A IF dos conídios foi observada nas três espécies. Exposições a doses maiores que 20 J $cm^{-2}$ provocaram redução de aproximadamente 4 logs na sobrevivência de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* e de aproximadamente 5 logs na sobrevivência de *A. nidulans*. A lavagem para a retirada do FS não ligado não impediu a IF dos conídios de nenhuma das três espécies. Para alguns tratamentos, foi observada uma redução na IF; entretanto, a redução não foi significativa.

O S137 foi mais eficaz que o NMBN na IF dos conídios das três espécies. Concentrações de apenas 10 µM do FS foram capazes de provocar uma redução de pelo menos 4 logs na sobrevivência dos conídios das três espécies. A lavagem dos conídios para a retirada do FS não ligado não impediu a IF.

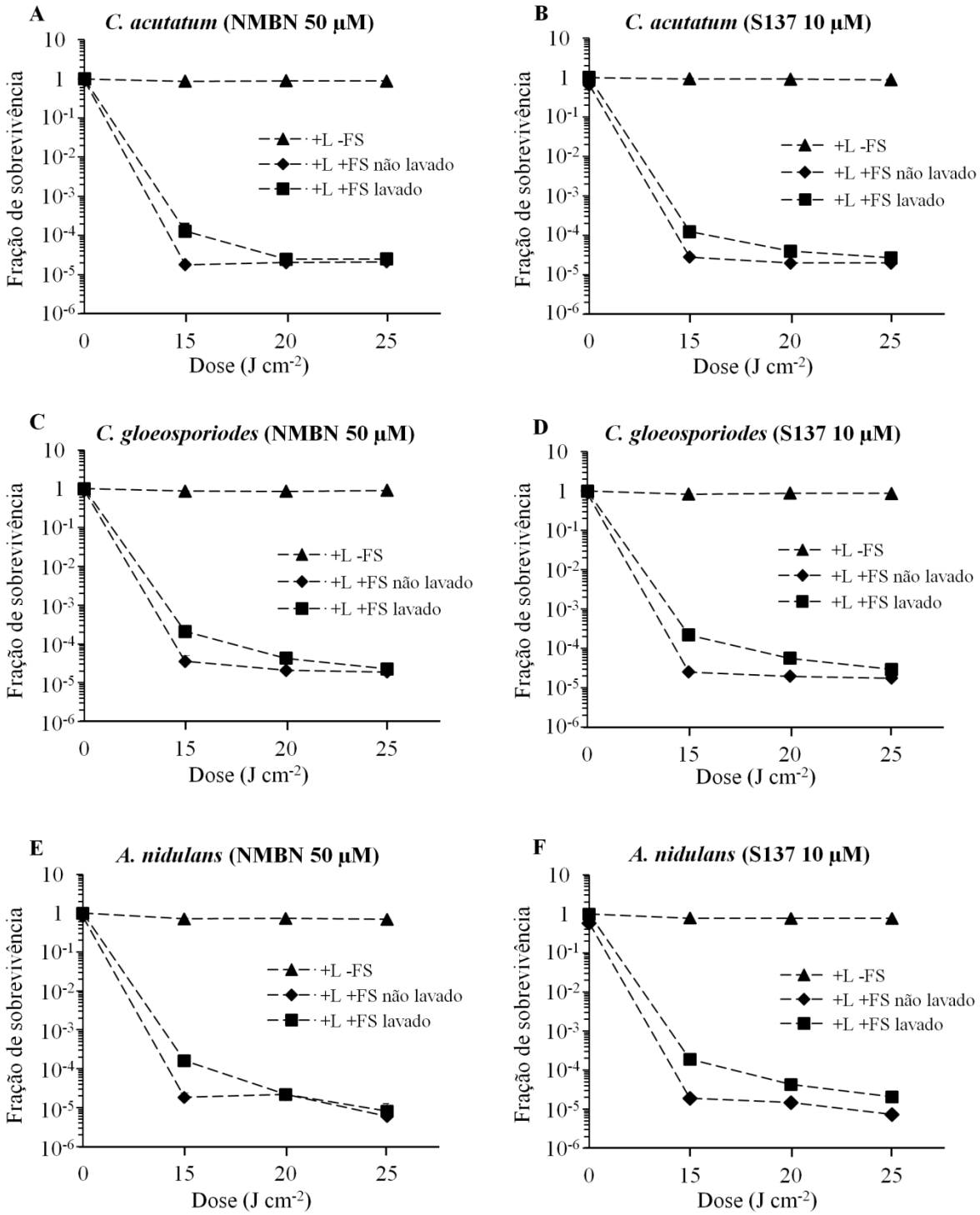


**Figura 8 –** Inativação fotodinâmica de conídios de (A e B) *C. acutatum*, (C e D) *C. gloeosporioides* e (E e F) *A. nidulans* com NMBN e S137. Os conídios foram incubados com o FS e, a seguir, lavados ou não para a retirada do FS não ligado, antes de serem expostos às diferentes doses de luz. Cada valor é a média de três experimentos independentes e a barra indica o desvio padrão da média

A internalização dos FS fenotiazínicos (NMBN e S137) e do corante Sudan III nos conídios de *C. acutatum* e o seu acúmulo em estruturas citoplasmáticas foram observados por microscopia ótica convencional (Figura 9 e 10). Os conídios também foram corados com os corantes fluorescentes FM®4-64 (Invitrogem, EUA), que possui afinidade por membranas, corando vacúolos e vesículas secretoras, e DAPI (Sigma, EUA), que possui afinidade por DNA.

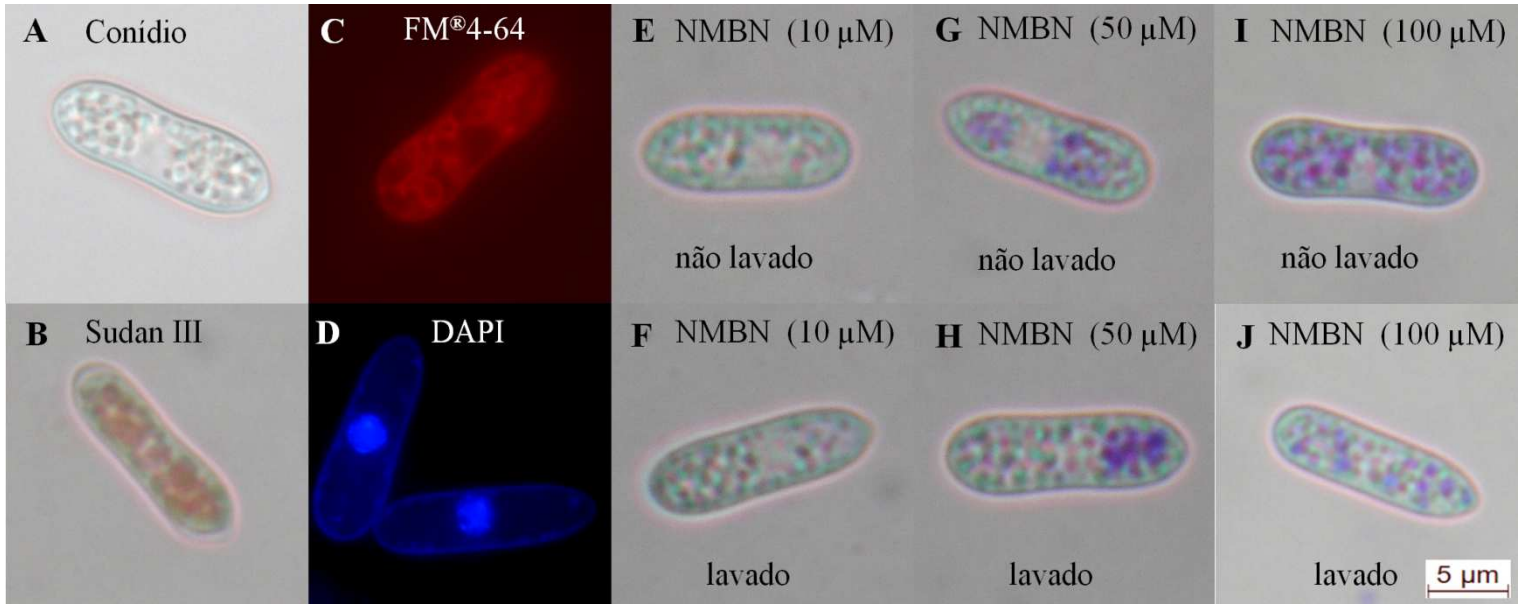


**Figura 9 –** Tratamento dos conídios de *C. acutatum* com o FS NMBN (10, 50 e 100 µM) e com os corante Sudan III (0,5 %), FM®4-64 (8 µM) e DAPI (3,5 mM). (A) conídio não tratado com os FS e nem com o corante; (B) conídio tratado com Sudan III, (C) conídio tratado com FM®4-64, (D) conídio tratado com DAPI, (E) conídio tratado com o NMBN (10 µM) e não lavado, (F) conídio tratado com o NMBN (10 µM) e, a seguir, lavado para a retirada do excesso de FS, (G) conídio tratado com o NMBN (50 µM) e não lavado, (H) conídio tratado com NMBN (50 µM) e lavado, (I) conídio tratado com o NMBN (100 µM) e não lavado, e (J) conídio tratado com NMBN (100 µM) e lavado

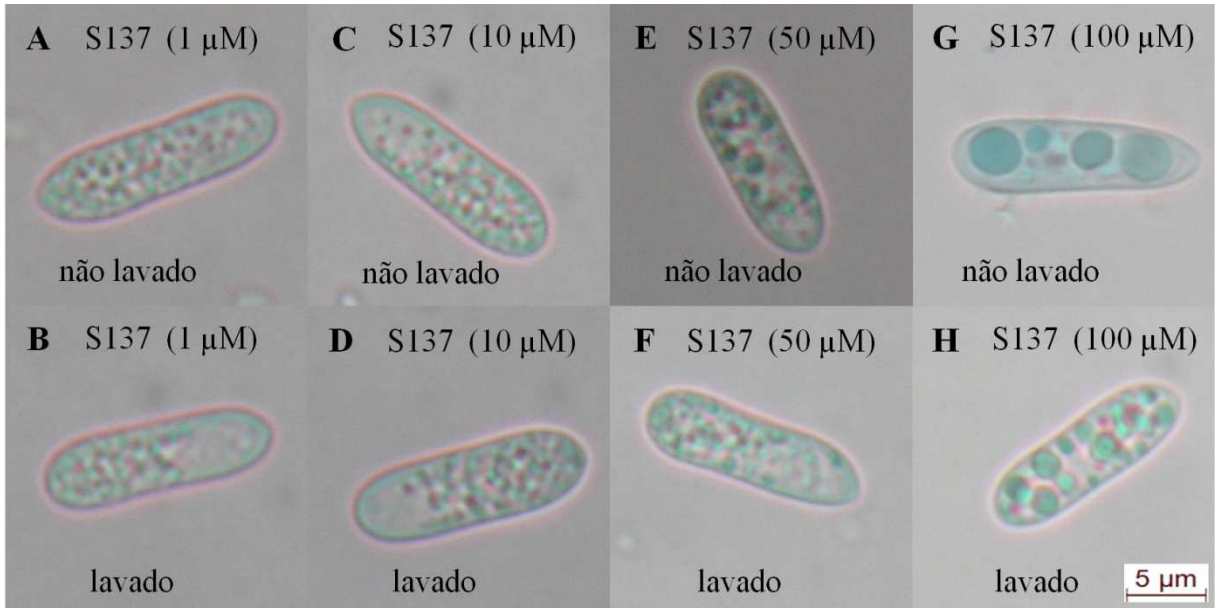


**Figura 10 –** Tratamento dos conídios de *C. acutatum* com o FS S137 (1, 10, 50 e 100 µM). (A) conídio tratado com o S137 (1 µM) e não lavado, (B) conídio tratado com o S137 (1 µM) e, a seguir, lavado para a retirada do excesso de FS, (C) conídio tratado com o S137 (10 µM) e não lavado, (D) conídio tratado com o S137 (10 µM) e lavado (E) conídio tratado com o S137 (50 µM) e não lavado, (F) conídio tratado com S137 (50 µM) e lavado, (G) conídio tratado com o S137 (100 µM) e não lavado e (H) conídio tratado com S137 (100 µM) e lavado

### 4.3.2. Furanocumarina e cumarinas

Os efeitos do TF com as furanocumarinas e cumarinas, usando a radiação solar como fonte de luz, foram avaliados em conídios de *C. acutatum* e *A. nidulans*. Os experimentos foram conduzidos nos dias 3 e 17 de abril de 2012. As irradiâncias de UV (290-400 nm) e as temperaturas determinadas durante os experimentos são mostrados na Figura 11. Ao contrário das fontes artificiais de luz, a radiação solar foi deletéria aos conídios. Exposições de apenas 1 h à radiação solar mataram 15% e 44% dos conídios de *C. acutatum* e *A. nidulans*, respectivamente; exposições de 2 h mataram 55% e 80% dos conídios, respectivamente.

As Figuras de 12 a 15 mostram o efeito dos TF [com 8-MOP, fração 1 (F1) e fração 2 (F2)] na sobrevivência dos conídios de *C. acutatum*, e *A. nidulans*. As duas frações foram obtidas da água da saída da concentradora, conforme descrito anteriormente. Os TF com o 8-MOP, F1 e F2 fotoinativaram os conídios das duas espécies; entretanto, os efeitos foram maiores em *A. nidulans*. O TF com 8-MOP e F1 foram mais eficazes do que com F2 em *C. acutatum*. O TF com a concentração de 50 µM (10,8 mg $L^{-1}$) do 8-MOP e 2 h de exposição reduziu em aproximadamente 4 logs a sobrevivência de *C. acutatum*. A redução foi de aproximadamente 3 logs para a F1 (12,5 mg $L^{-1}$) e aproximadamente 1,5 log para a F2 (50 µM, 12,3 mg $L^{-1}$). A lavagem para a retirada do FS não ligado não impediu a IF dos conídios das duas espécies; entretanto, para alguns tratamentos, foi observada uma grande redução na eficácia do TF.

A internalização do 8-MOP nos conídios de *C. acutatum* e o seu acúmulo em estruturas citoplasmáticas foram observados por microscopia ótica de fluorescência (Figura 16). O 8-MOP difundiu-se por todo o citoplasma.

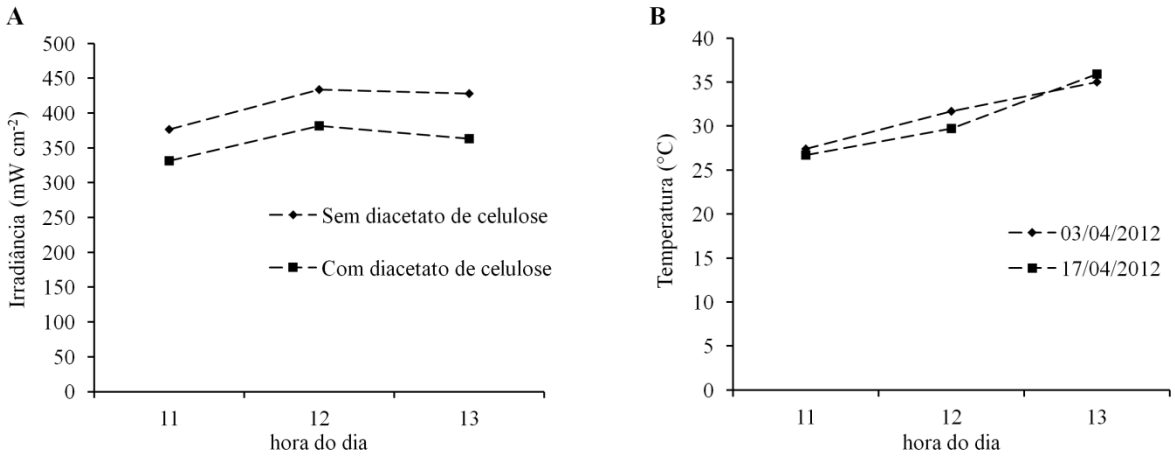


**Figura 11 –** (A) Irradiâncias de UV (290-400 nm) e (B) temperaturas registradas em intervalos de 1 h durante os experimentos realizados nos dias 3 e 17 de abril de 2012, entre as 11 h e as 13 h

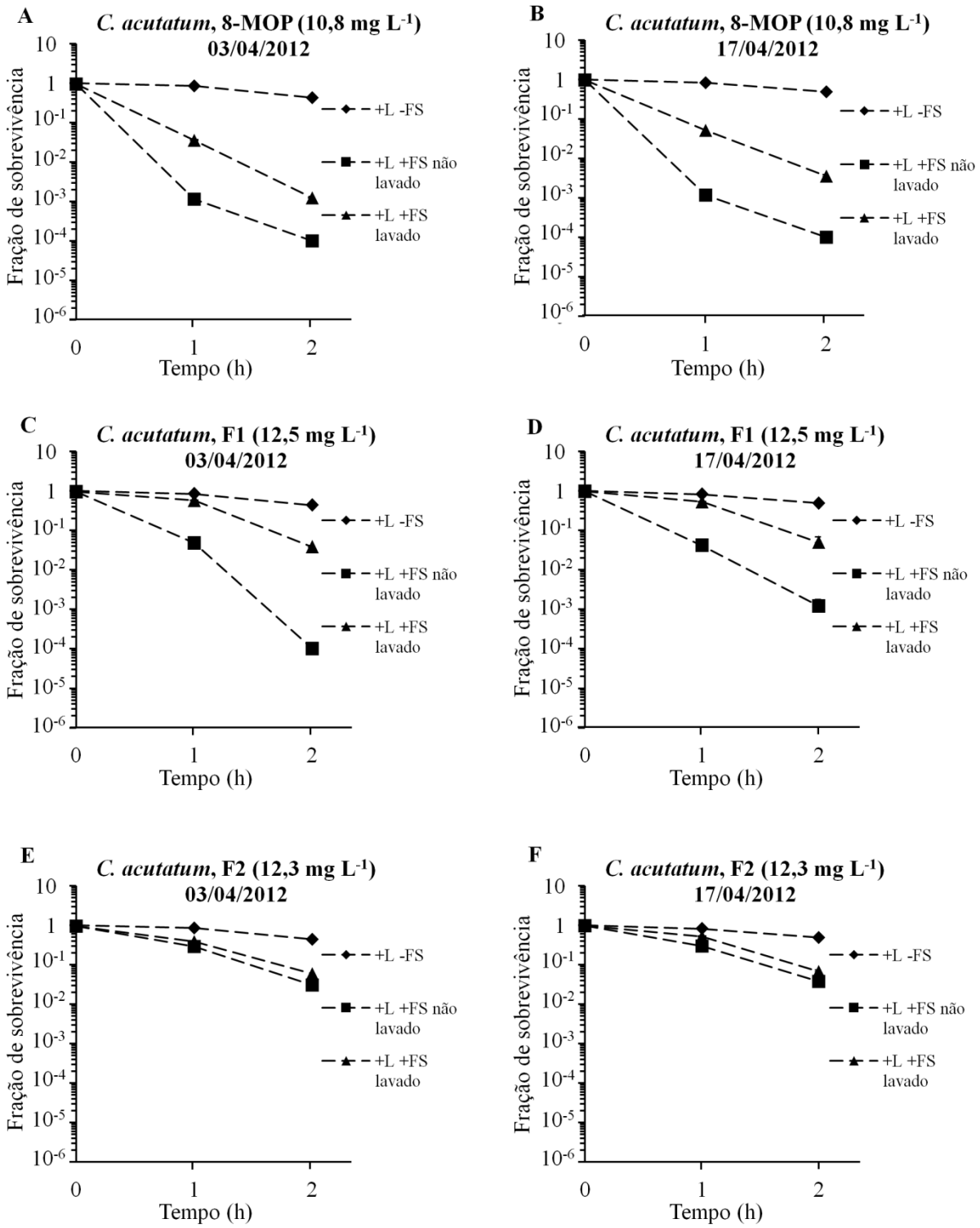


**Figura 12 –** IF de conídios de *C. acutatum*, com o 8-MOP, F1 e F2. Os conídios foram incubados com o FS e, a seguir, lavados ou não para a retirada do FS não ligado, antes de serem expostos às diferentes doses de luz. Cada valor é a média de dois experimentos e a barra indica o desvio padrão da média

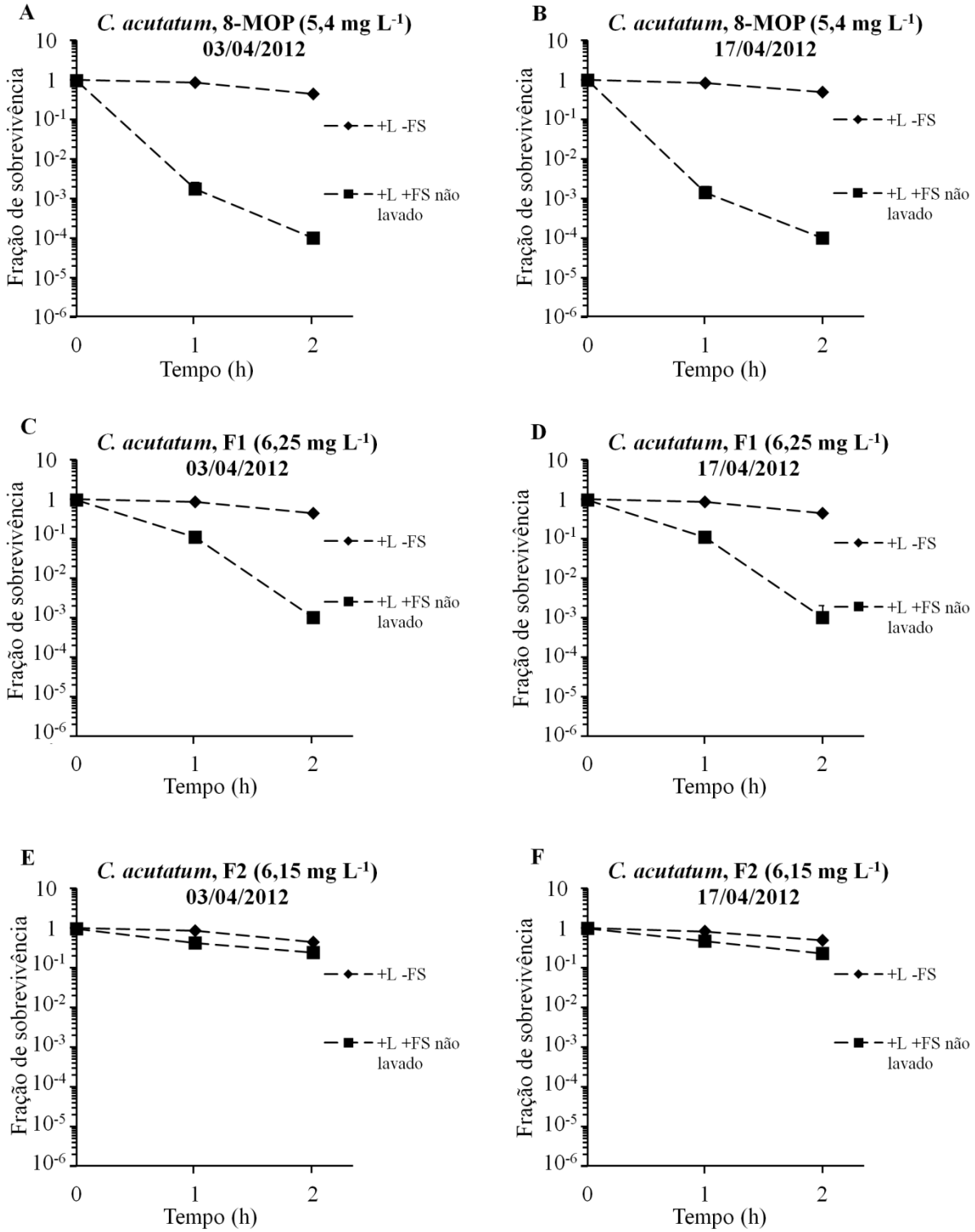


**Figura 13 –** IF de conídios de *C. acutatum*, com o 8-MOP, F1 e F2. Os conídios foram incubados com o FS e expostos às diferentes doses de luz. Cada valor é a média de dois experimentos e a barra indica o desvio padrão da média

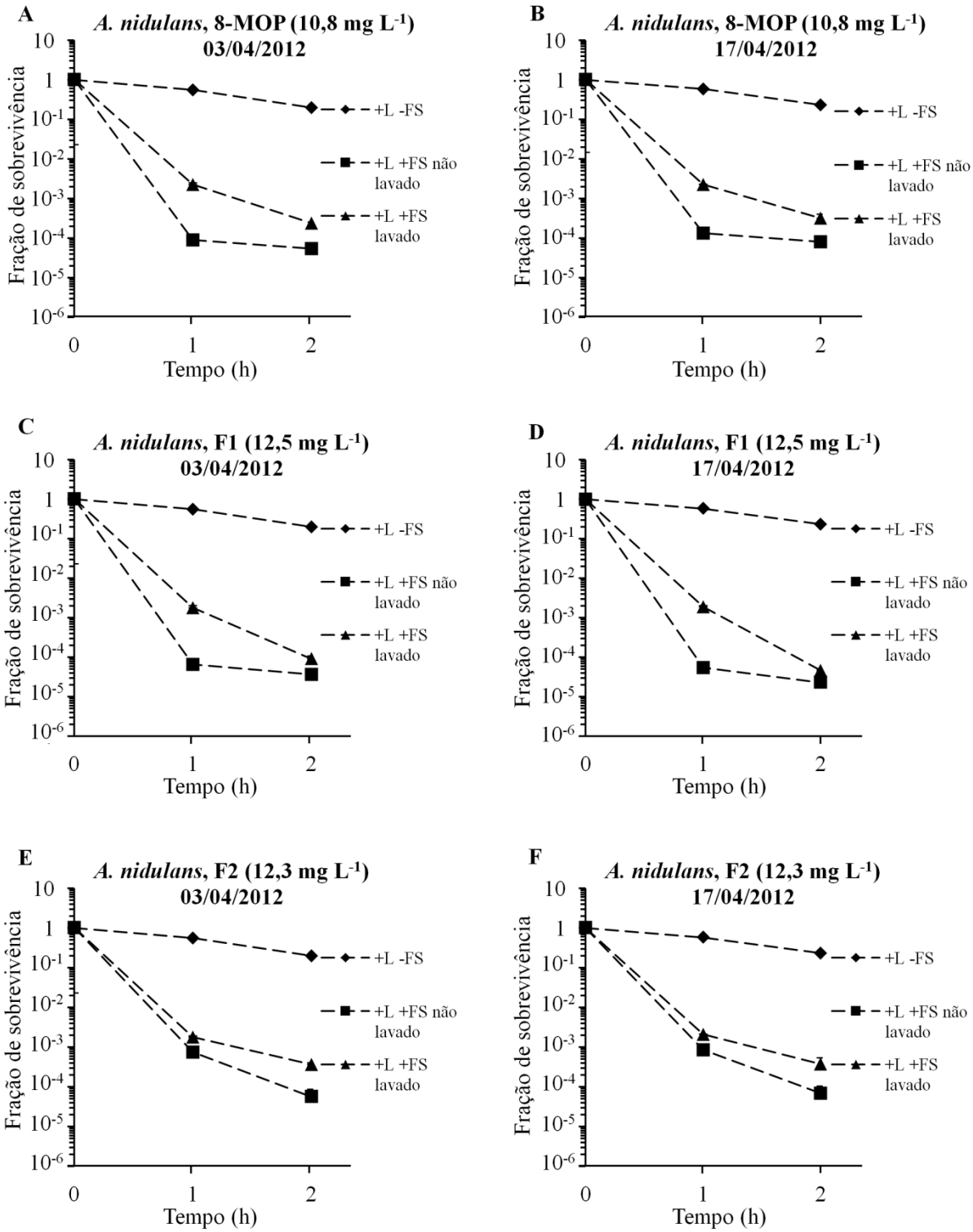


**Figura 14 –** IF de conídios de *A. nidulans*, com o 8-MOP, F1 e F2. Os conídios foram incubados com o FS e, a seguir, lavados ou não para a retirada do FS não ligado, antes de serem expostos às diferentes doses de luz. Cada valor é a média de dois experimentos e a barra indica o desvio padrão da média

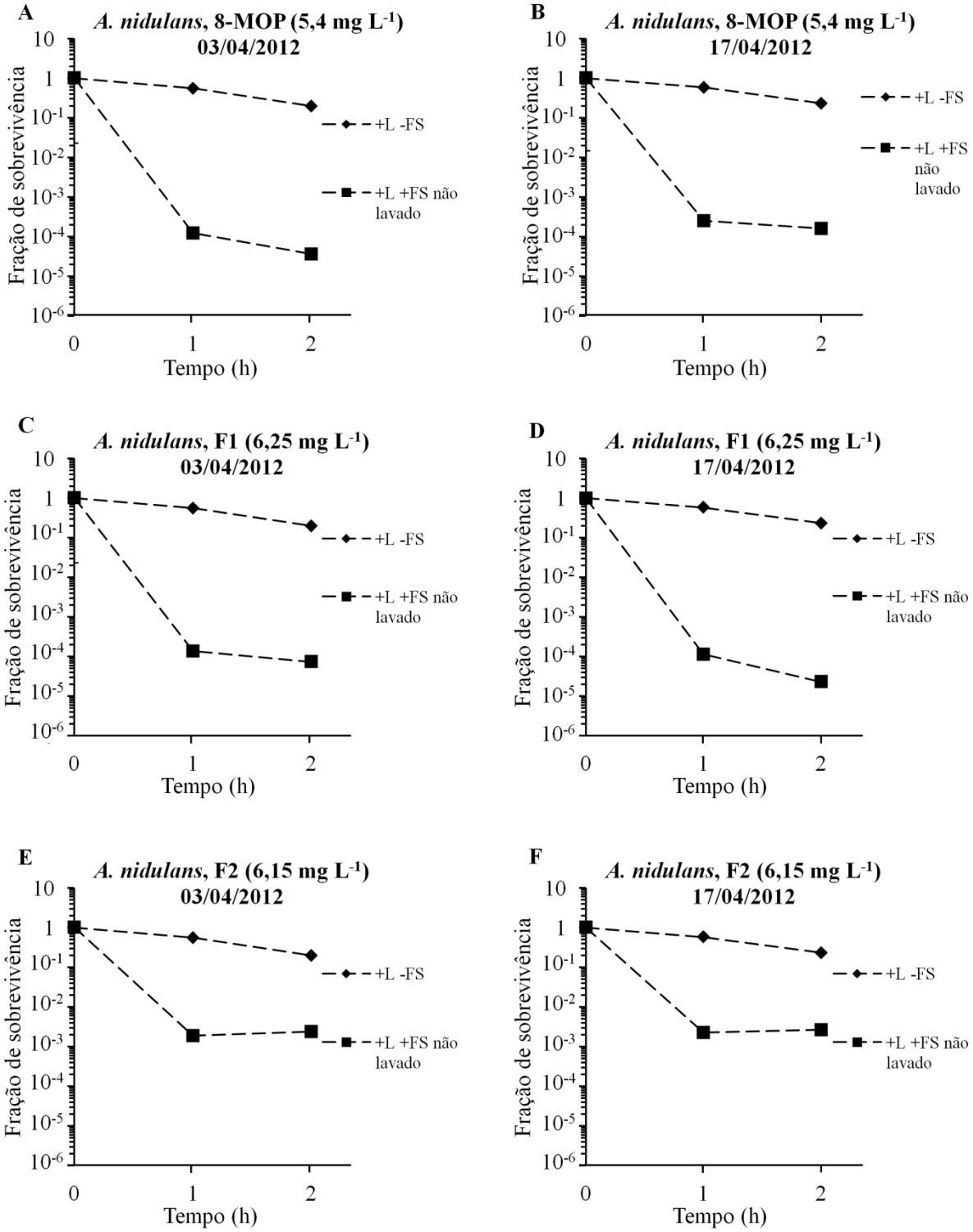


**Figura 15 –** IF de conídios de *A. nidulans*, com o 8-MOP, F1 e F2. Os conídios foram incubados com o FS e expostos às diferentes doses de luz. Cada valor é a média de dois experimentos e a barra indica o desvio padrão da média

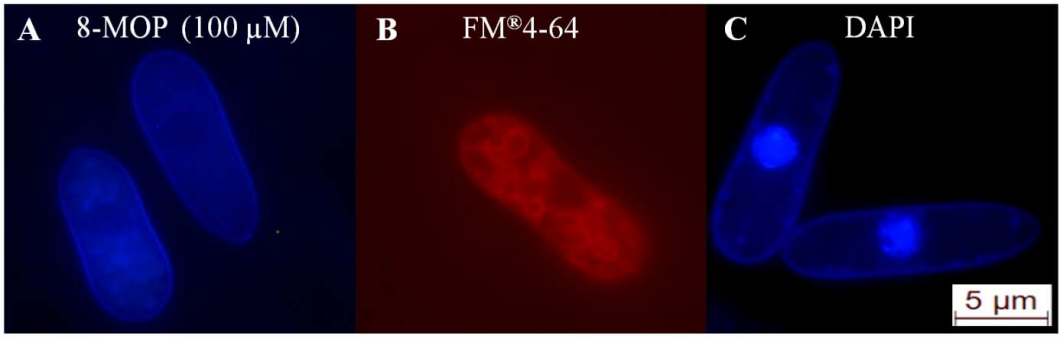


**Figura 16 –** Conídios de *C. acutatum* tratados com (A) 8-MOP (100 µM), (B) FM®4-64 (8 µM) e (C) DAPI (3,5 mM) e observados com microscópio de fluorescência com ampliação de 1000×

**4.4. Efeito da aplicação dos FS na superfície de folhas adultas de mudas de laranja pera (*Citrus sinensis*)**

As Figuras 17 e 18 mostram folhas de laranja pera após a aplicação dos FS fenotiazínicos e cumarínicos. Para avaliar os efeitos da aplicação dos FS nas folhas da laranja, 5 µL de soluções dos FS MB, TBO, NMBN, S137 e 8-MOP, na concentração de 10,8 g $L^{-1}$, e de soluções das frações isoladas da água da saída da concentradora [F1 (12,5 g $L^{-1}$) e F2 (12,3 g $L^{-1}$ µM)] foram colocados na superfície superior das folhas. As plantas foram mantidas ao ar livre com regime normal de luz. Duas horas após a aplicação, as gotas já haviam secado. Os experimentos foram conduzidos no mês de abril de 2012. As plantas foram avaliadas diariamente por até 3 semanas. Como observado nas Figuras 17 e 18 não foi observada nenhuma lesão ou alteração na morfologia das folhas durante o período de avaliação.

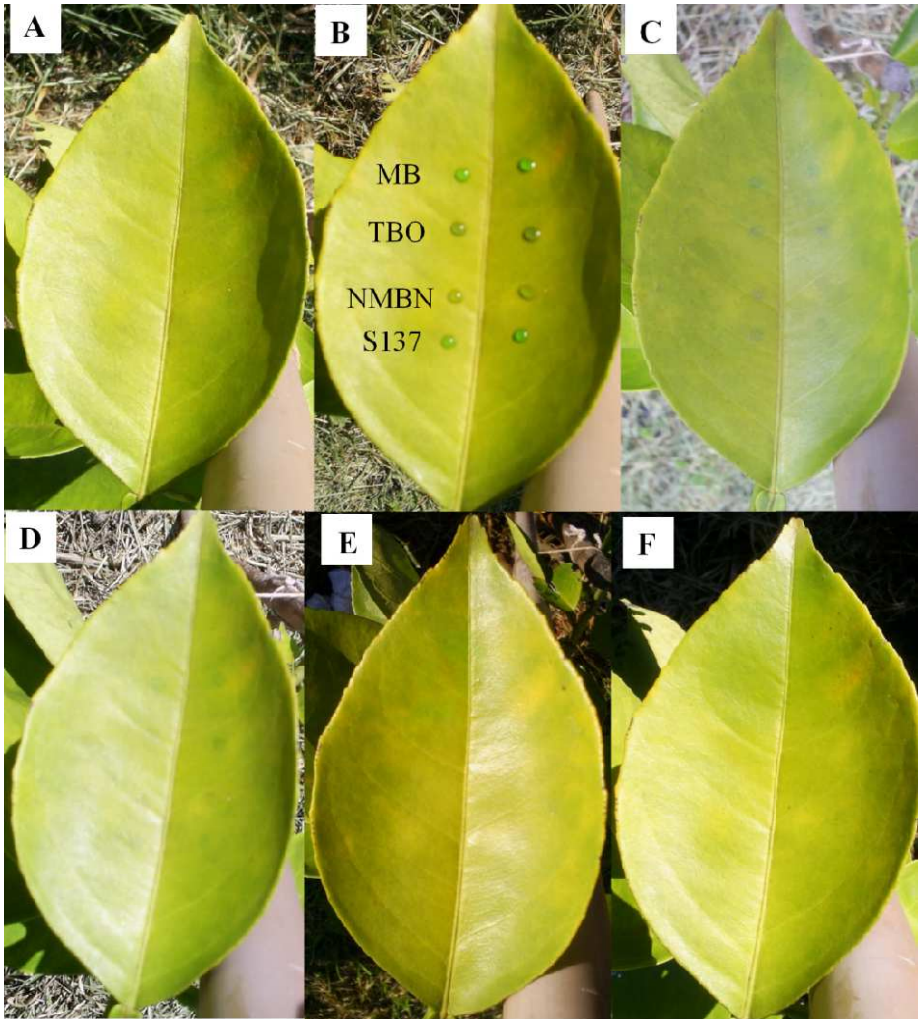


**Figura 17 –** Efeito da exposição simultânea ao sol e aos FS fenotiazínicos em folhas de mudas de laranja pera (*Citrus sinensis*). (A) folhas antes da aplicação, (B) imediatamente após a aplicação de MB, TBO, NMBN e S137, (C) duas horas após a aplicação, (D) 72 h após a aplicação, (E) uma semana após a aplicação e (F) três semanas após a aplicação

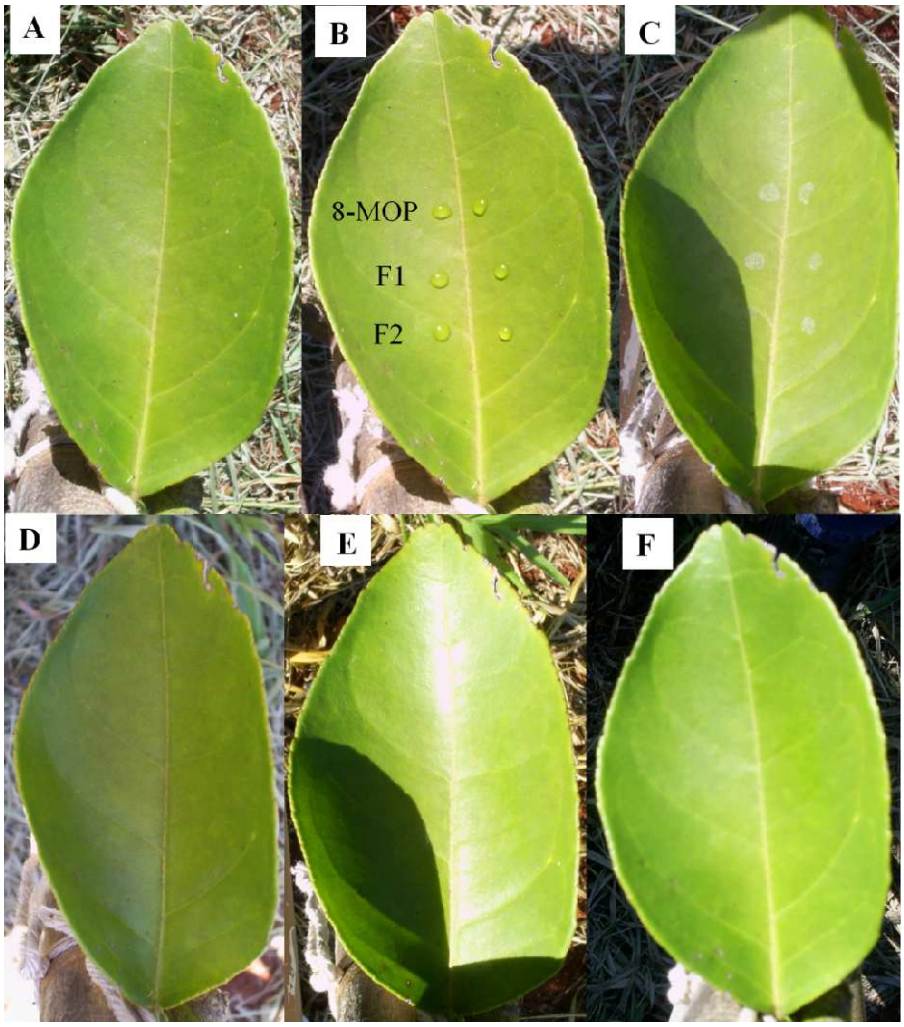


**Figura 18 –** Efeito da exposição simultânea ao sol e ao FS 8-MOP em folhas de mudas de laranja pera (*Citrus sinensis*). (A) folhas antes da aplicação, (B) imediatamente após a aplicação de 8-MOP, fração 1 (F1) e fração 2 (F2), (C) duas horas após a aplicação, (D) 72 h após a aplicação, (E) uma semana após a aplicação e (F) três semanas após a aplicação

### 4.4.1. Estudos histológicos de folhas de laranja pera (*Citrus sinensis*) após tratamento com os FS fenotiazícos

A microscopia óptica de campo claro foi utilizada para verificar se ocorreu a penetração dos FS fenotiazínicos MB (19A), TBO (19B), NMBN (19C) e S137 (19D) após a aplicação na superfície adaxial de folhas adultas de laranja pera As micrografias indicaram que nenhum dos FS colocado na superfície atravessou a cúticula. O aspecto que os tecidos da folha adquirem quando são corados com os mesmos FS (após o corte transversal da folha) é mostrado como parâmetro de comparação (Figuras 19E-H).

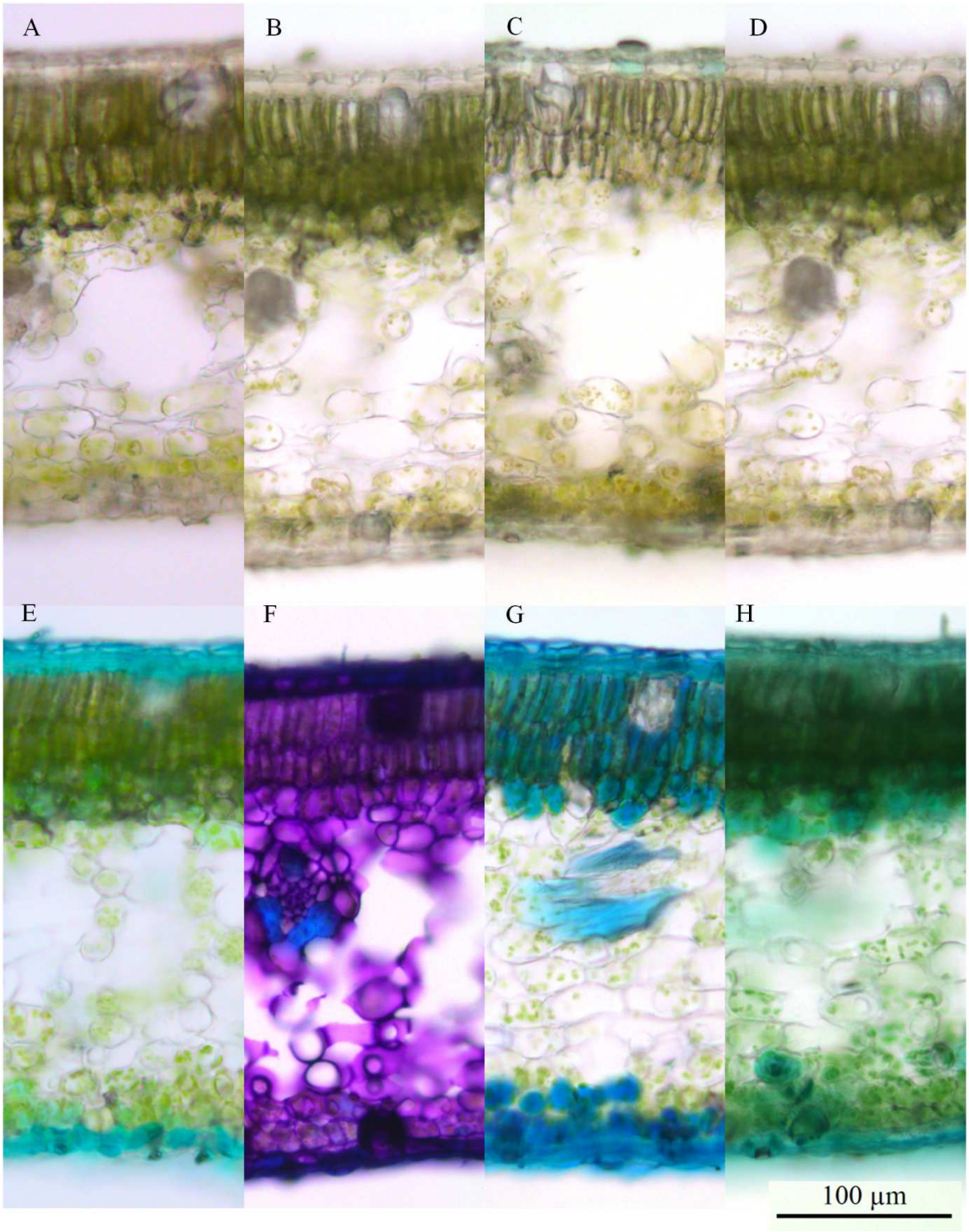


**Figura 19 –** Aspecto dos tecidos de folhas adultas de laranja pera após a colocação dos FS (10 µL, 100 µM) na superfície adaxial. Após a secagem das soluções, foram feitos cortes transversais das folhas para a análise histológica. As folhas foram tratadas com os FS: (A) MB, (B) TBO, (C) NMBN e (D) S137. Corte transversal de folhas corados com os FS: (E) MB, (F) TBO, (G) NMBN e (H) S137

## 4.5. Extração de furanocumarinas e cumarinas de produtos, subprodutos e resíduos do processamento industrial do limão Tahiti (*Citrus latifolia*)

### 4.5.1. Determinação da melhor fonte para extração de furanocumarina e cumarinas

A presença de cumarinas e/ou furanocumarinas foi avaliada em produtos (óleo da casca e fase oleosa da essência), em subprodutos (bagaço com casca e bagacilho) e em resíduos (água da saída da concentradora, água da descarga da polidora, bagaço com casca e bagacilho) do processamento industrial do limão Tahiti. Os extratos do óleo da casca e da água da saída da concentradora apresentaram em cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) a maior intensidade de fluorescência quando expostos à radiação UV, que é característica de substâncias com anéis aromáticos, como as furanocumarinas e cumarinas. A água da saída da concentradora foi escolhida para o isolamento de furanocumarinas e cumarinas. Ao contrario do óleo da casca (também rico em cumarinas e/ou furanocumarinas), a água da saída da concentradora é um resíduo industrial sem valor comercial, gerado em grande quantidade e descartado pela indústria citrícola. Dessa forma, a utilização desse resíduo para a produção de FS agregaria valor à cadeia produtiva citrícola.

### 4.5.2. Extração de furanocumarina e cumarina da água da saída da concentradora

A partir de 2100 mL de água da saída da concentradora, obteve-se uma massa de 7,85 g de extrato bruto. A separação das furanocumarinas e cumarinas presentes no extrato bruto foi feita por meio da cromatografia líquida clássica (CLC), usando-se sílica gel como fase estacionária e hexano/AcOEt, com gradiente de polaridade crescente, como fase móvel. Com essa fase móvel, foram obtidas 9 frações. Posteriormente, foi usado metanol na coluna cromatográfica para a retirada do resíduo retido na fase estacionária. Nessa etapa, foram obtidas duas frações adicionais. As frações foram concentradas a vácuo e submetida à CCDC.

As frações 3 e 4 da CLC apresentaram fluorescência característica de furanocumarinas e cumarinas. A fração 3 foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). Foram obtidas duas frações e a fração 2 foi enviada para análise de RMN para se tentar elucidar a estrutura do seu constituinte. Entretanto, não foi possível analisar os dados de RMN de hidrogênio obtidos dessa fração. A fração 4 obtida na CLC também foi estudada. A fração foi novamente submetida à CLC (fase estacionária: sílica gel, fase móvel: hexano/AcOEt com gradiente de polaridade 96:4). A partir de 390 mg da fração 4, foram obtidas 3 frações. As duas frações com maior massa foram analisadas por métodos espectroscópicos (RMN uni e bidimensional), aliados a dados previamente descritos na literatura científica, e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

A análise por CG-EM (Figura 20) da fração 1 teve como objetivo identificar as substâncias majoritárias (com as maiores áreas) de acordo com o índice de similaridade (maior que 80%) proposto na biblioteca de padrões do equipamento utilizado para as análises.

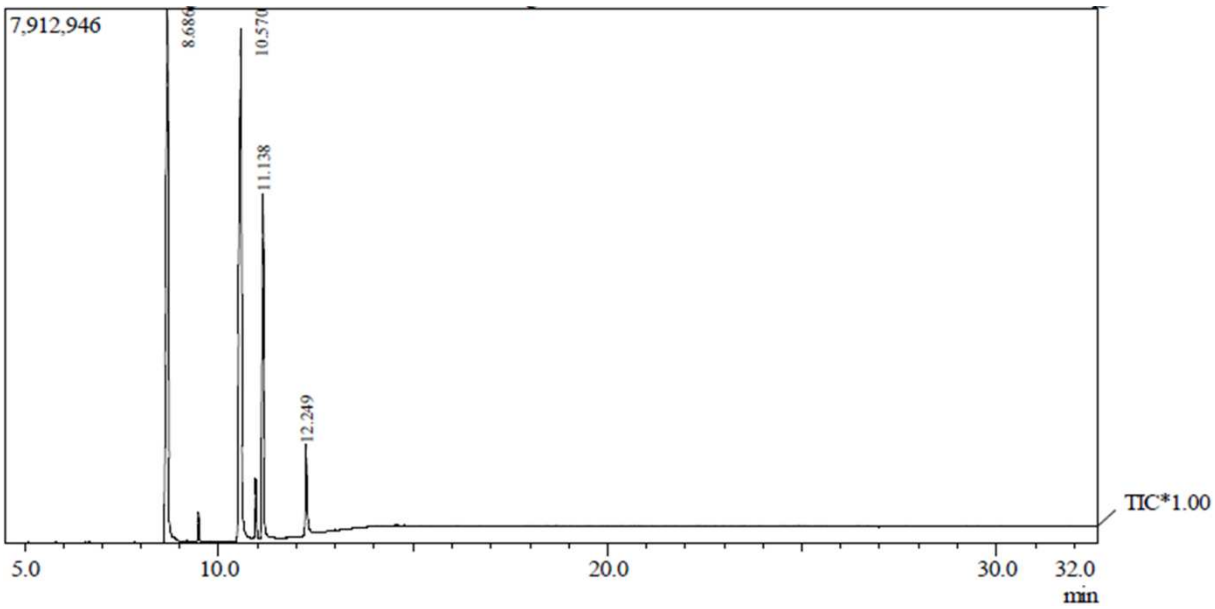


**Figura 20 –** Cromatograma obtido por CG-EM da fração 1

Por meio do cromatograma dos íons totais (Figura 20) e dos respectivos espectros de massa (Figuras 21 e 22), foi possível identificar duas substâncias majoritárias (com maior área), que estão descritas na tabela 9.

**Tabela 9 –** Composição química da fração 1

| Substância | Fórmula Molecular | $M^{\bullet+}$ | $t_R$ (min) | Área (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | $C_{10}H_8O_3$ | 176 | 8,72 | 35,97 |
| 2 | $C_{11}H_{10}O_4$ | 206 | 10,61 | 41,54 |

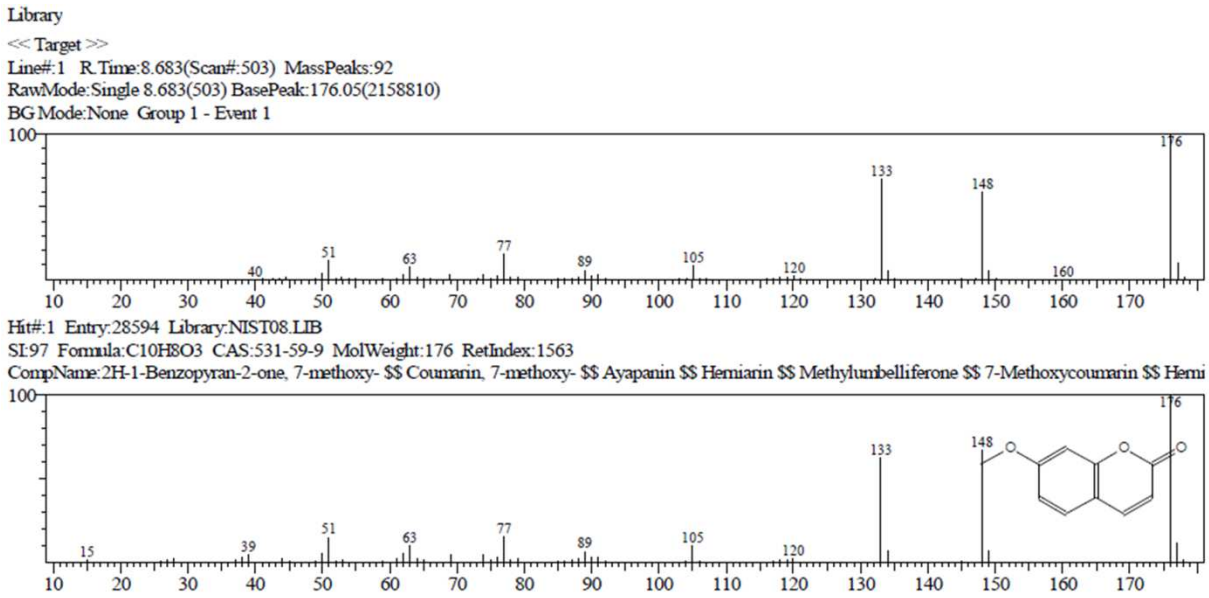


**Figura 21 –** Espectro de massas (EM) obtido por CG-EM para a substância 1 da fração 1 com $t_R$= 8,68 min e comparado com o EM contido na biblioteca de padrões

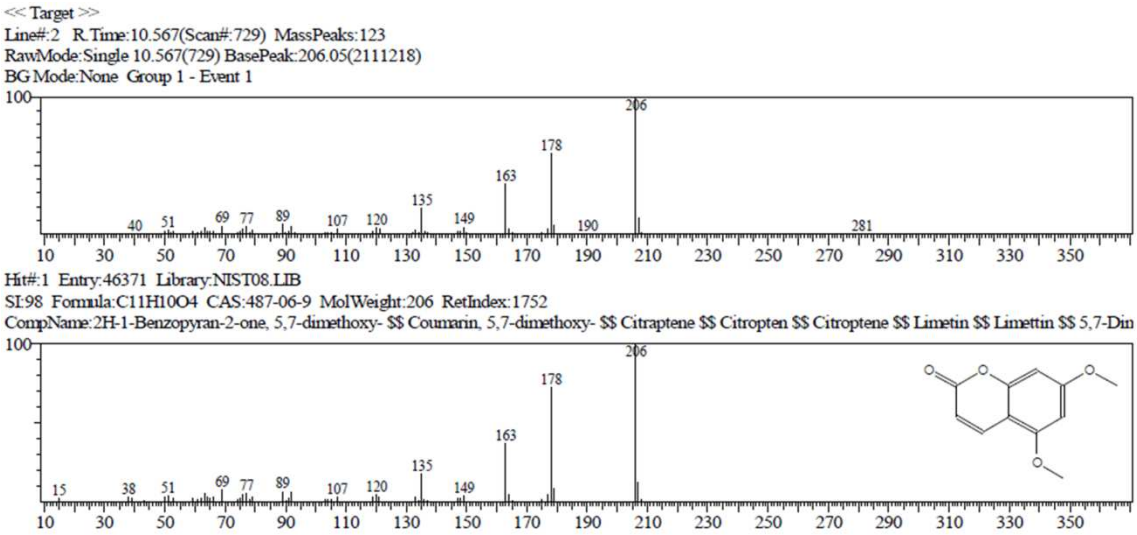


**Figura 22 –** Espectro de massas (EM) obtido por CG-EM para a substância 2 da fração 1 com $t_R$= 10,56 min e comparado com o EM contido na biblioteca de padrões

As substâncias da fração 1 também foram submetidas à análise de RMN de $^1$H, que permite analisar o deslocamento químico ($\delta$) dos hidrogênios presentes na substância, que, juntamente com os dados obtidos dos mapas de contorno do HMQC, possibilitaram fazer atribuições dos carbonos ligados a hidrogênio. Os mapas de contorno do HMBC permitiram estabelecer as correlações entre hidrogênios e carbonos, possibilitando a atribuição dos carbonos quaternários e a confirmação da estrutura da molécula, como mostram as Figuras 23-29 e Tabela 10.

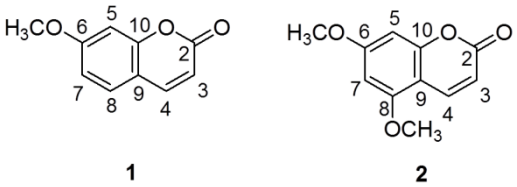


**Figura 23 –** Sugestão para a estrutura química das substâncias presentes na fração 1

**Tabela 10 –** Dados de RMN de $^1$H obtidos pela análise do espectro das substâncias presentes na fração1

| **Posição** | **$\delta_H$ 1(*J*= Hz)** | **$\delta_H$ (Leão *et al.*, 2011)** | **$\delta_H$2.(*J*= Hz)** | **$\delta_H$ (Leão *et al.*, 2011)** |
|---|---|---|---|---|
| 1 | - | | - | |
| 2 | - | | - | |
| 3 | 6,2 (*d*, *J*= 9,0) | 6,3 (*d*, *J*= 9,7) | 6,1 (*d*, *J*= 9,7) | 6,1 (*d*, *J*= 9,6) |
| 4 | 7,6 (*d*, *J*= 9,0) | 8,1 (*d*, *J*= 9,7) | 7,9 (*d*, *J*= 9,7) | 8,0 (*d*, *J*= 9,6) |
| 5 | 6,7 (*d*, *J*= 2,3) | 6,8 (*d*, *J*= 2,3) | 6,3 (*d*, *J*= 2,0) | 6,3 (*d*, *J*= 2,1) |
| 6 | - | | - | - |
| 7 | 6,8 (*dd*, *J*= 2,3 e *J*= 8,5) | 6,8 (*dd*, *J*= 2,3 e *J*= 8,5) | 6,2 (*d*, *J*= 2,0) | 6,4 (*d*, *J*= 2,1) |
| 8 | 7,3 (*d*, *J*= 8,5) | 7,4 (*d*, *J*= 8,5) | - | |
| 9 | - | - | - | |
| 10 | - | - | - | |
| $OCH_3$ | 3,8 | 3,9 | 3,7<br>3,8 | 3,8<br>3,9 |

Pela análise do espectro de RMN de $^1$H, notou-se que a fração 1 é uma mistura das substâncias 1 e 2. Ao se analisarem as integrais dos sinais no espectro, foi observado que a proporção da substância 1 é de aproximadamente 3 para 1 da substância 2. Assim, o espectro (Tabela 9 e Figura 21) mostrou a presença da substância 1 na fração 1, pelo dubleto em $\delta$ 6,2 (*J*= 9,0 Hz) e outro em $\delta$ 7,6 (*J*= 9,0 Hz), que correspondem aos hidrogênios dos carbonos 3 e 4, respectivamente, ou seja, os hidrogênios do anel pirônico em configuração *Z*. Os sinais dos hidrogênios aromáticos foram identificados em $\delta$ 6,7 (*d*, *J*= 2,3 Hz, H-5), $\delta$ 6,8 (*dd*, *J*= 2,3 e *J*= 8,5, H-7) e $\delta$ 7,3 (*d*, *J*= 8,5, H-8). Já a metoxila ligada ao carbono 6 foi identificada em $\delta$ 3,8.

Com relação à substância 2, presente na fração 1 em menor proporção, os hidrogênios do anel pirônico (também em configuração *Z*) foram identificados em $\delta$ 6,1 (*d*, *J*= 9,7, H-3) e $\delta$ 7,9 (*d*, *J*= 9,7, H-4). Além disso, identificaram-se dois dubletos de hidrogênios do anel aromático, um em $\delta$ 6,3 (*J*= 2,0, H-5) e o outro em $\delta$ 6,2 (*J*= 2,0, H-7). Por fim, foram

identificadas duas metoxilas ligadas aos carbonos do anel aromático, uma em $\delta$ 3,8 e a outra em $\delta$ 3,9.

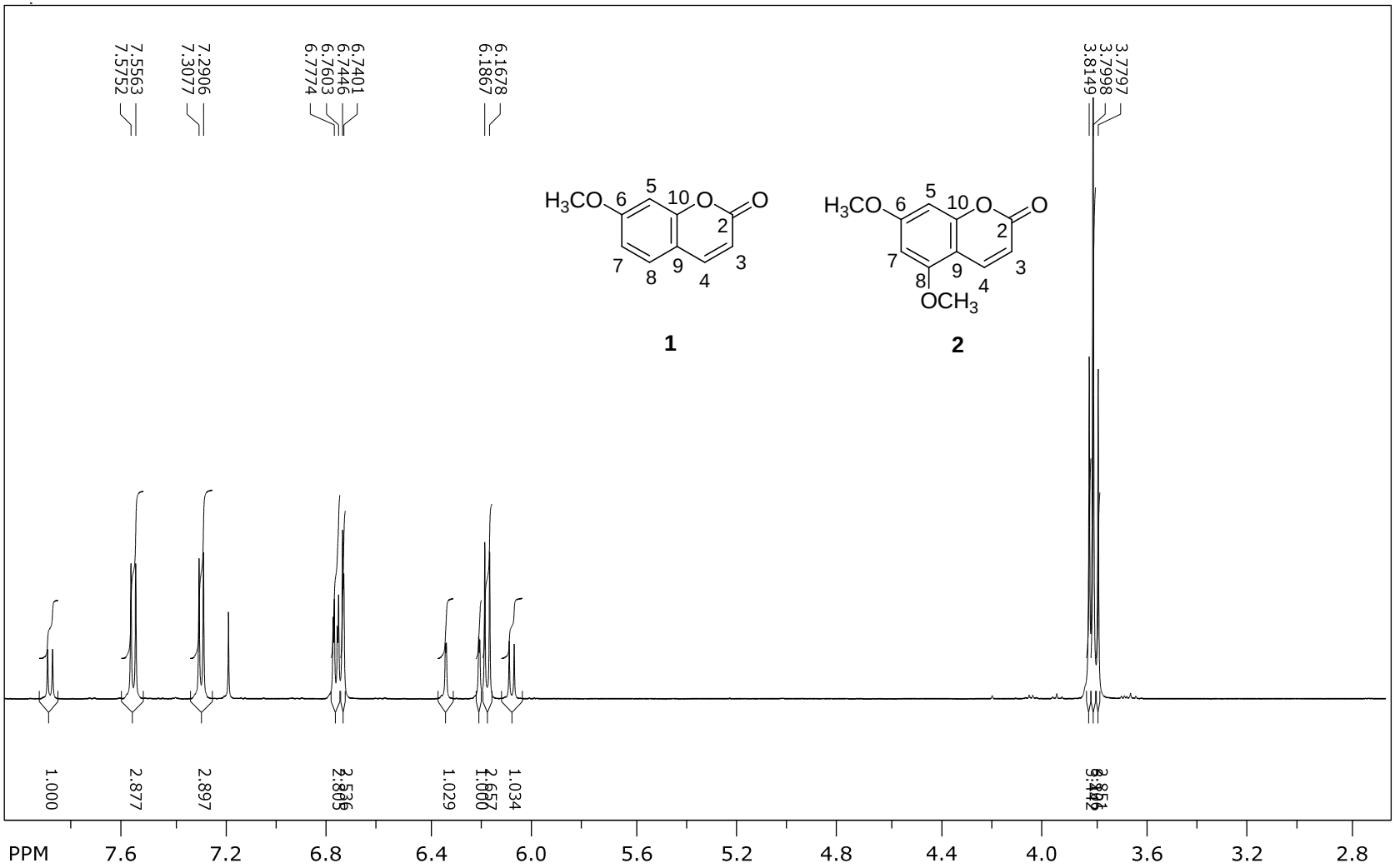


**Figura 24 –** Espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz) das substâncias presentes na fração 1, obtido em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$)

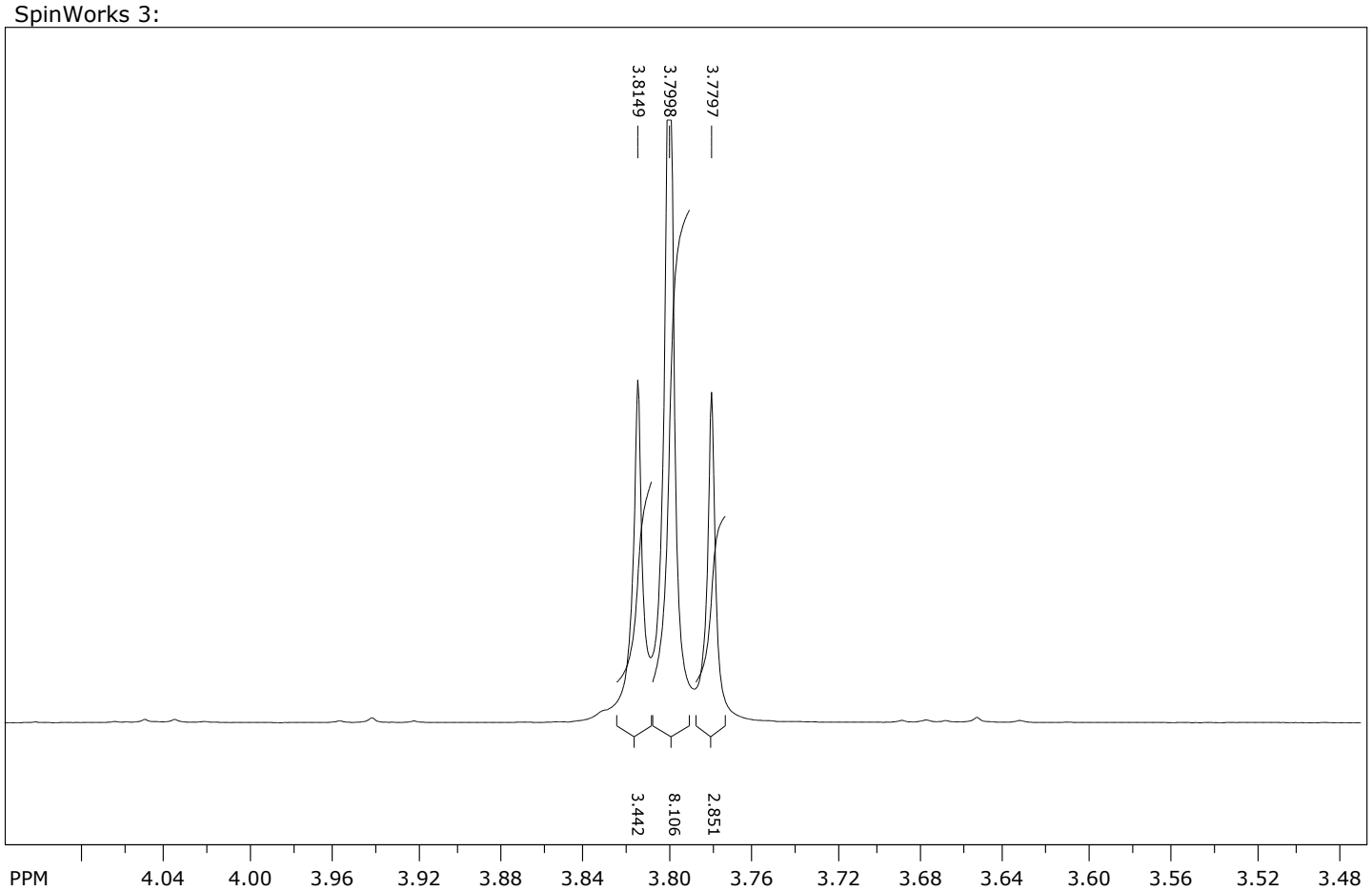


**Figura 25 –** Ampliação do espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz), na região do deslocamento químico de 3,48-4,08 das substâncias presentes na fração 1 obtido em $CDCl_3$

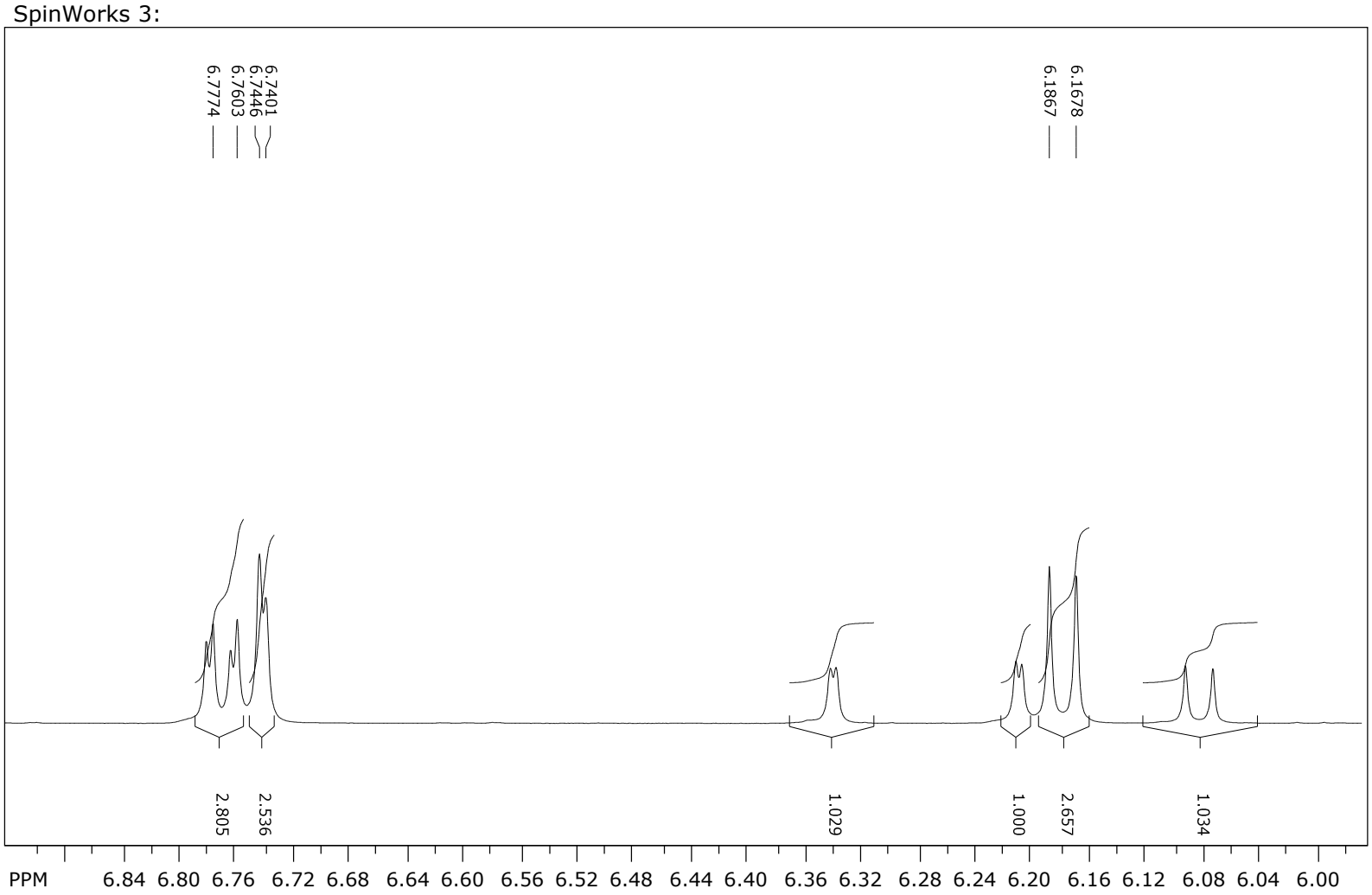


**Figura 26 –** Ampliação do espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz), na região do deslocamento químico de 6,00-6,84 das substâncias presentes na fração 1, obtido em $CDCl_3$

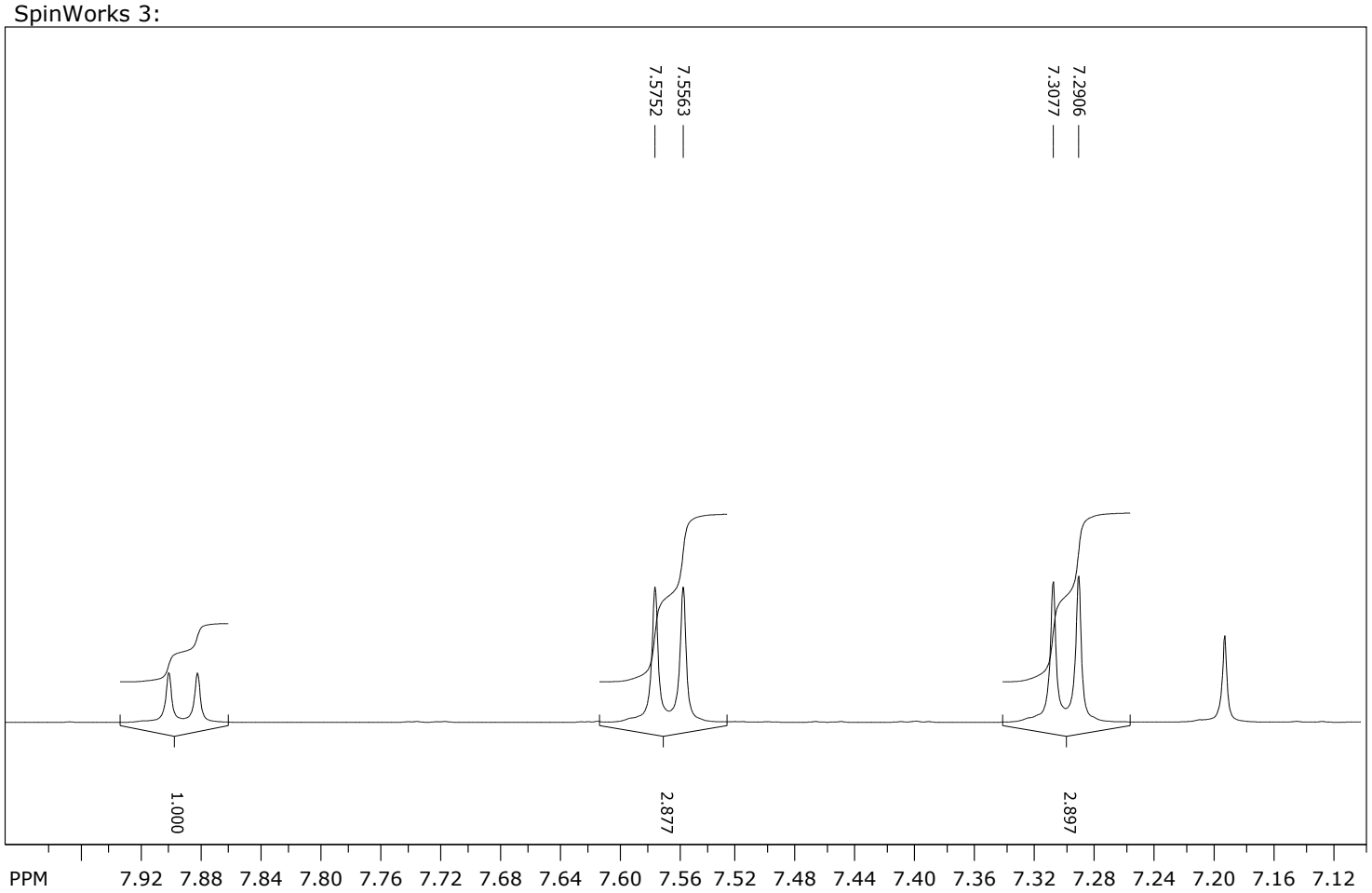


**Figura 27 –** Ampliação do espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz), na região do deslocamento químico de 7,12-7,92 das substâncias presentes na fração 1, obtido em $CDCl_3$

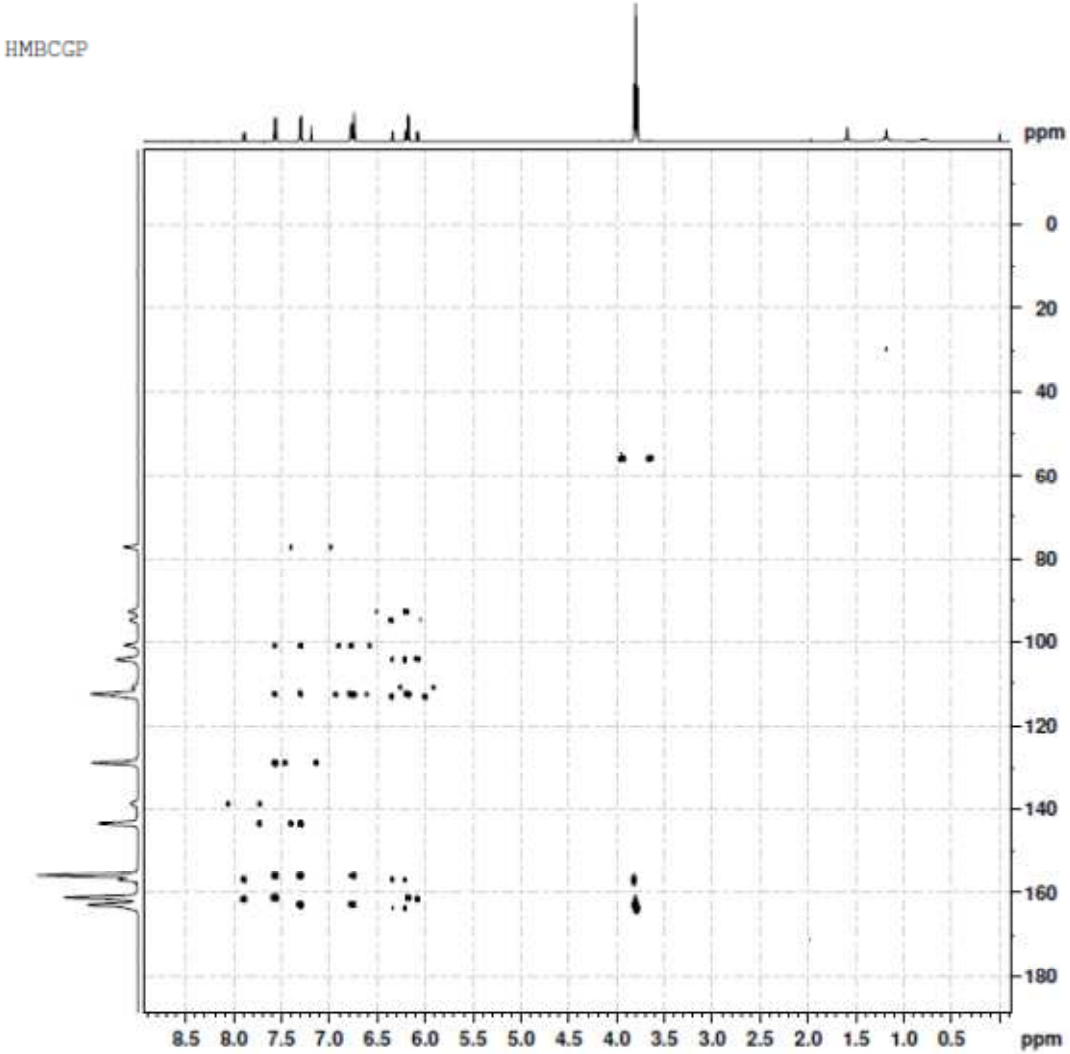


**Figura 28 –** Mapa de contorno HMBC (500 MHz) das substâncias presentes na fração 1, obtido em $CDCl_3$

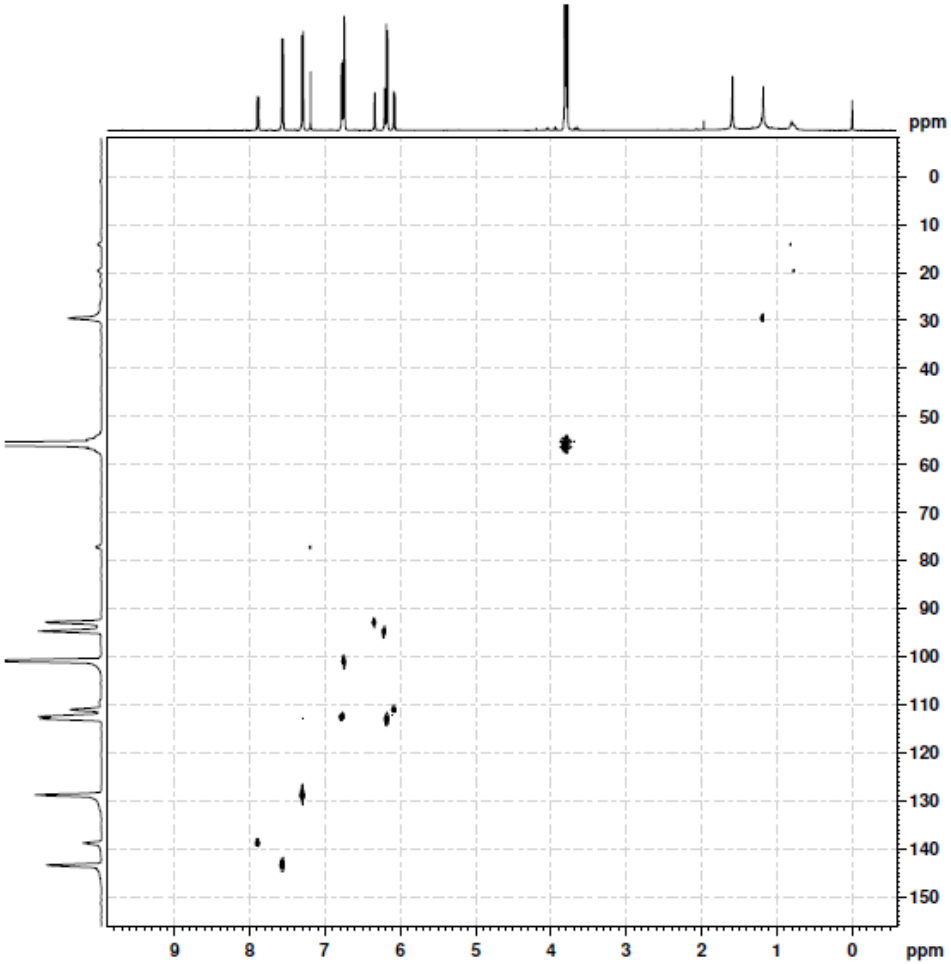


**Figura 29 –** Mapa de contorno HMQC (400 MHz) das substâncias presentes na fração 1, obtido em $CDCl_3$

A fração 2 também foi analisada por métodos espectrométricos (RMN uni e bidimensional), aliados a dados previamente descritos na literatura científica e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). A análise por CG-EM (Figura 30) mostrou que a substância presente na fração 2 apresenta tempo de retenção de 12,29 minutos, massa molecular de 246 g $mol^{-1}$, fórmula molecular $C_{13}H_{10}O_5$ e porcentagem de área relativa de 90,11%. O espectro de massa (Figura 31) exibiu um íon molecular em *m/z* 246 e íon fragmentado em *m/z* 231 ($–CH_3$) e *m/z* 216 ($–OCH_3$).

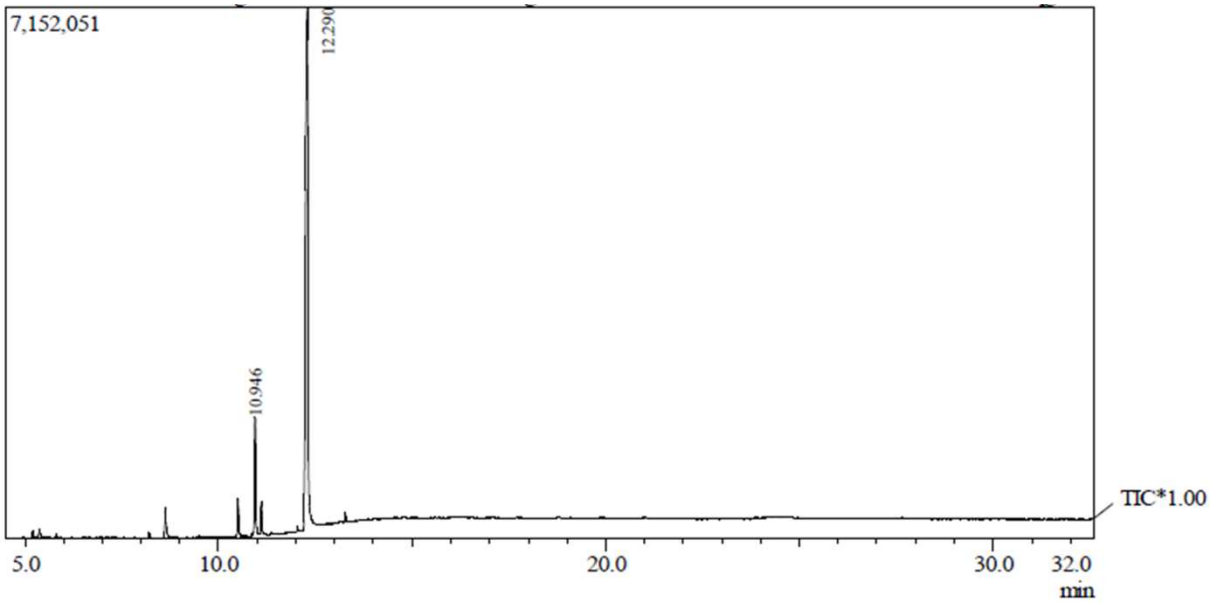


**Figura 30 –** Cromatograma obtido por CG-EM da fração 2

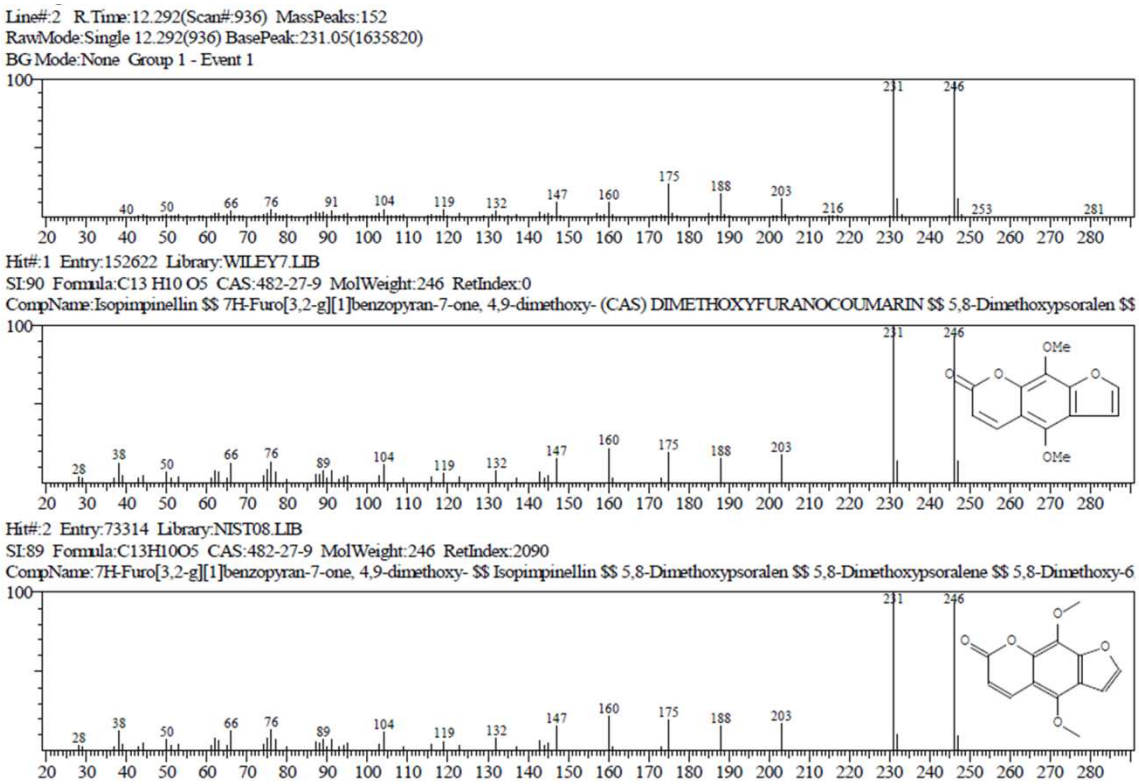


**Figura 31 –** Espectro de massas (EM) obtido por CG-EM para a substância da fração 2 com $t_R$= 12,29 min e comparado com o EM contido na biblioteca de padrões

As substâncias da fração 2 também foram submetidas à RMN de $^{1}H$, $^{13}C$ e DEPT, que permitem analisar o deslocamento químico ($\delta$) dos hidrogênios presentes na substância, que, juntamente com os dados obtidos dos mapas de contorno do HMQC, possibilitaram fazer atribuições dos carbonos ligados a hidrogênio. Os mapas de contorno do HMBC permitiram estabelecer as correlações entre hidrogênios e carbonos, possibilitando a atribuição dos carbonos quaternários e a confirmação da estrutura da molécula, como mostram as Figuras 32-38 e Tabela 11.

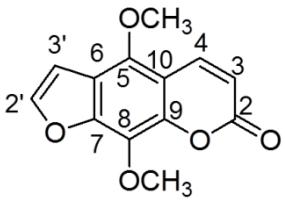


**Figura 32 –** Estrutura química da furanocumarina presente na fração 2 (isopimpinelina)

**Tabela 11 –** Dados de RMN de $^{1}H$ e $^{13}C$ obtidos pela análise dos espectros da furanocumarina isopimpinelina

| **Posição** | **$\delta_H$ (*J*= Hz)** | **$\delta_H$ (Bogucka-Kocka & Krzaczek, 2003)** | **$\delta_H$ (Setzer *et al.*, 2003)** | **$\delta_{c*}$** | **$\delta_c$ (Lehr *et al.*, 2003)** |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | | | | |
| 2 | - | | | 161,00 | 160,65 |
| 3 | 6,22 (*d*, *J*= 9,7) | 6,26 (*d*, *J*= 9,8) | 6,29 (*d*, *J*= 10) | 113,00* | 113,10 |
| 4 | 8,05 (*d*, *J*= 9,7) | 8,10 (*d*, *J*= 9,8) | 8,12 (*d*, *J*= 10) | 139,4* | 139,57 |
| 5 | - | | | 144,4 | |
| 6 | - | | | 117,0 | 115,03 |
| 7 | - | | | 150,0 | 150,22 |
| 8 | - | | | 128,0 | 128,21 |
| 9 | - | | | 143,8 | |
| 10 | - | | | 107,8 | 107,88 |
| 2’ | 7,5 (*d*, *J*= 1,5) | 7,62 (*d*, *J*= 2,3) | 7,63 (*d*, *J*= 2,0) | 145,2* | 145,32 |
| 3’ | 6,9 (*d*, *J*= 1,5) | 6,99 (*d*, *J*= 2,3) | 7,0 (*d*, *J*= 2,0) | 105,0* | 105,27 |
| $OCH_3$ | 4,095 (*s*) | 4,16 (*s*) | 4,17 | 60,90* | 61,92 |
| $OCH_3$ | 4,1018 (*s*) | 4,17 (*s*) | 4,17 | 61,75* | 61,05 |

*****As multiplicidades dos carbonos foram atribuídas pelo DEPT 135$^{o}$

A análise do espectro de RMN de $^{1}H$ (Tabela 11) mostrou dois singletos no deslocamento químico ($\delta$) 4,09 e 4,10 (Figura 33 e 34). Além disso, foi identificado um dubleto em $\delta$ 6,22 (*J*= 9,7 Hz) e outro em $\delta$ 8,05 (*J*= 9,7 Hz*)*, correspondentes aos hidrogênios dos carbonos 3 e 4, respectivamente, ou seja, os hidrogênios do anel pirônico em configuração *Z*. Por outro lado, os hidrogênios do anel furânico correspondem aos dubletos em $\delta$ 6,93 (*J*= 1,5 Hz, 3’) e $\delta$ 7,5 (*J*= 1,5 Hz, 2’) (Figura 33).

Na análise do espectro de RMN de $^{13}C$ (Tabela 11 e Figura 35 e 36), os sinais em $\delta$ 60,90 e $\delta$ 61,75 confirmaram a presença de dois grupos metoxílicos. Os sinais dos carbonos do anel furânico foram identificados em $\delta$ 105,0 e $\delta$ 145,2. Os carbonos do anel aromático ligados ao anel furânico foram identificados em $\delta$ 117,0 (C-6) e $\delta$ 150,0 (C-7), os ligados às metoxilas em $\delta$ 144,40 e $\delta$ 128,0 e os ligados à pirona em $\delta$ 107,77 e $\delta$ 143,8. Além disso, os carbonos do anel pirônico foram identificados em $\delta$ 161,0, $\delta$ 113,0 e $\delta$ 139,0, para a furanocumarina isopimpinelina.

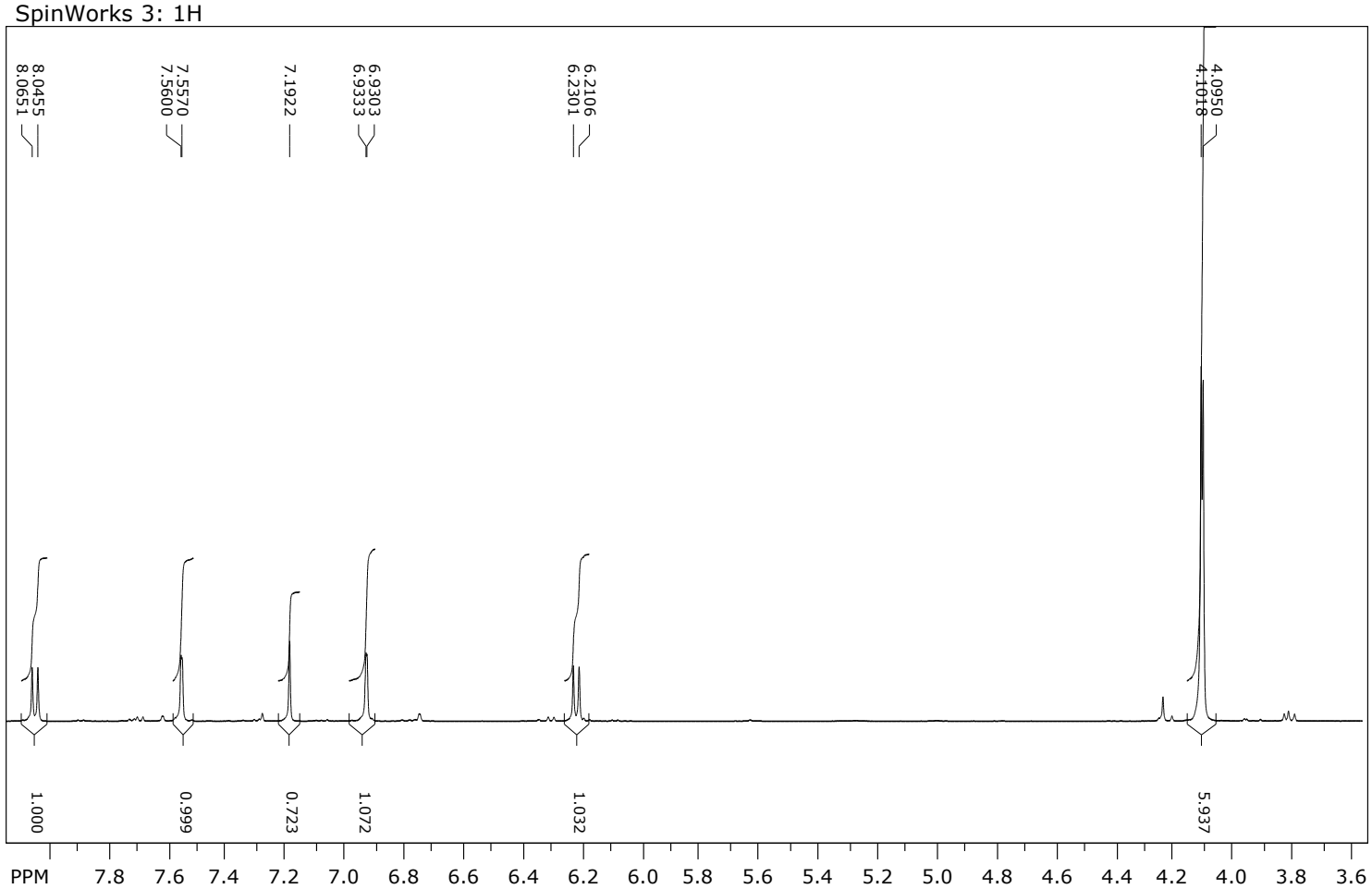


**Figura 33 –** Espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz) da furanocumarina presente na fração 2, obtido em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$)

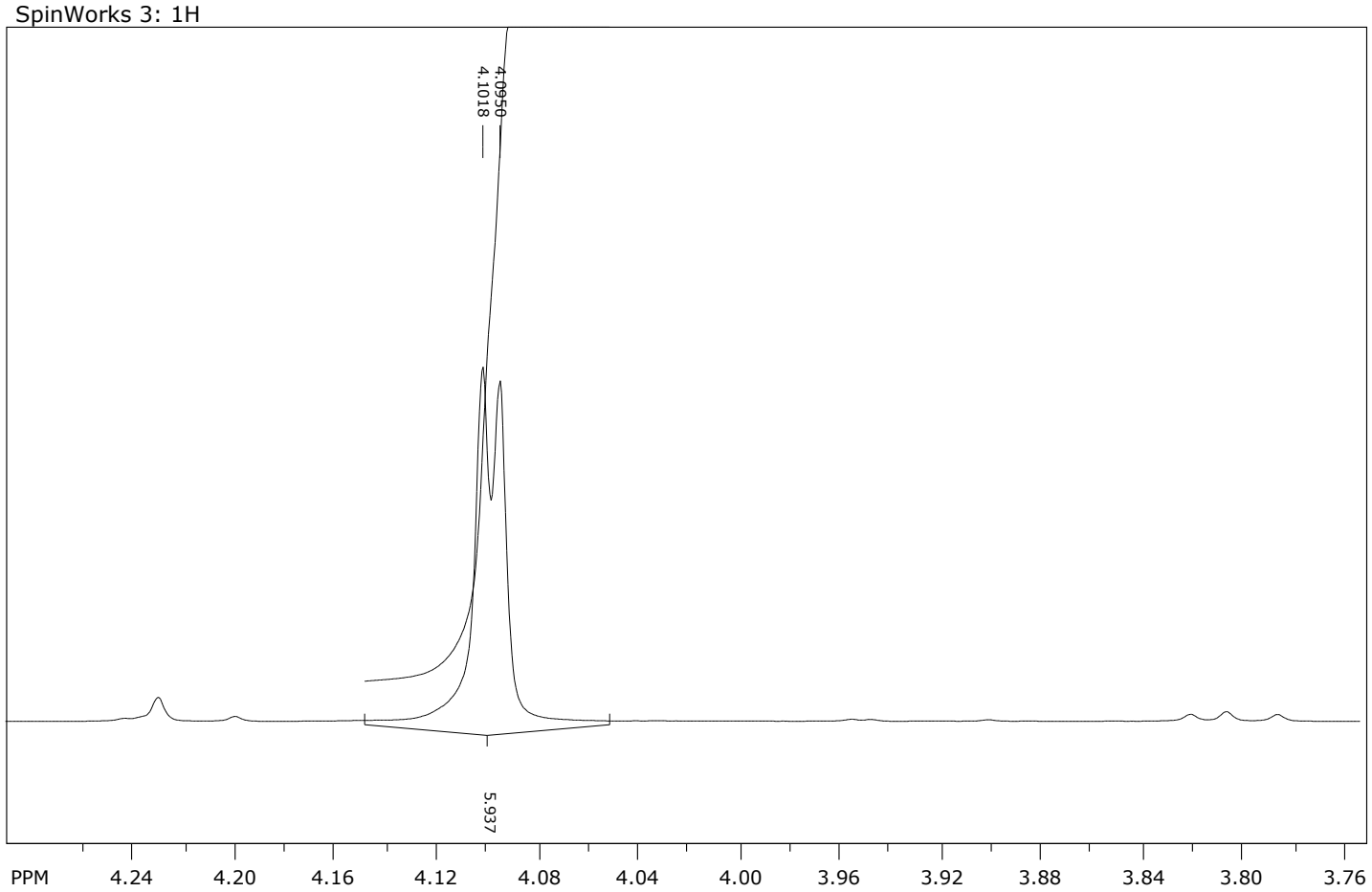


**Figura 34 –** Ampliação do espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz), na região do deslocamento químico de 3,76-4,24 da furanocumarina presente na fração 2 obtido em $CDCl_3$

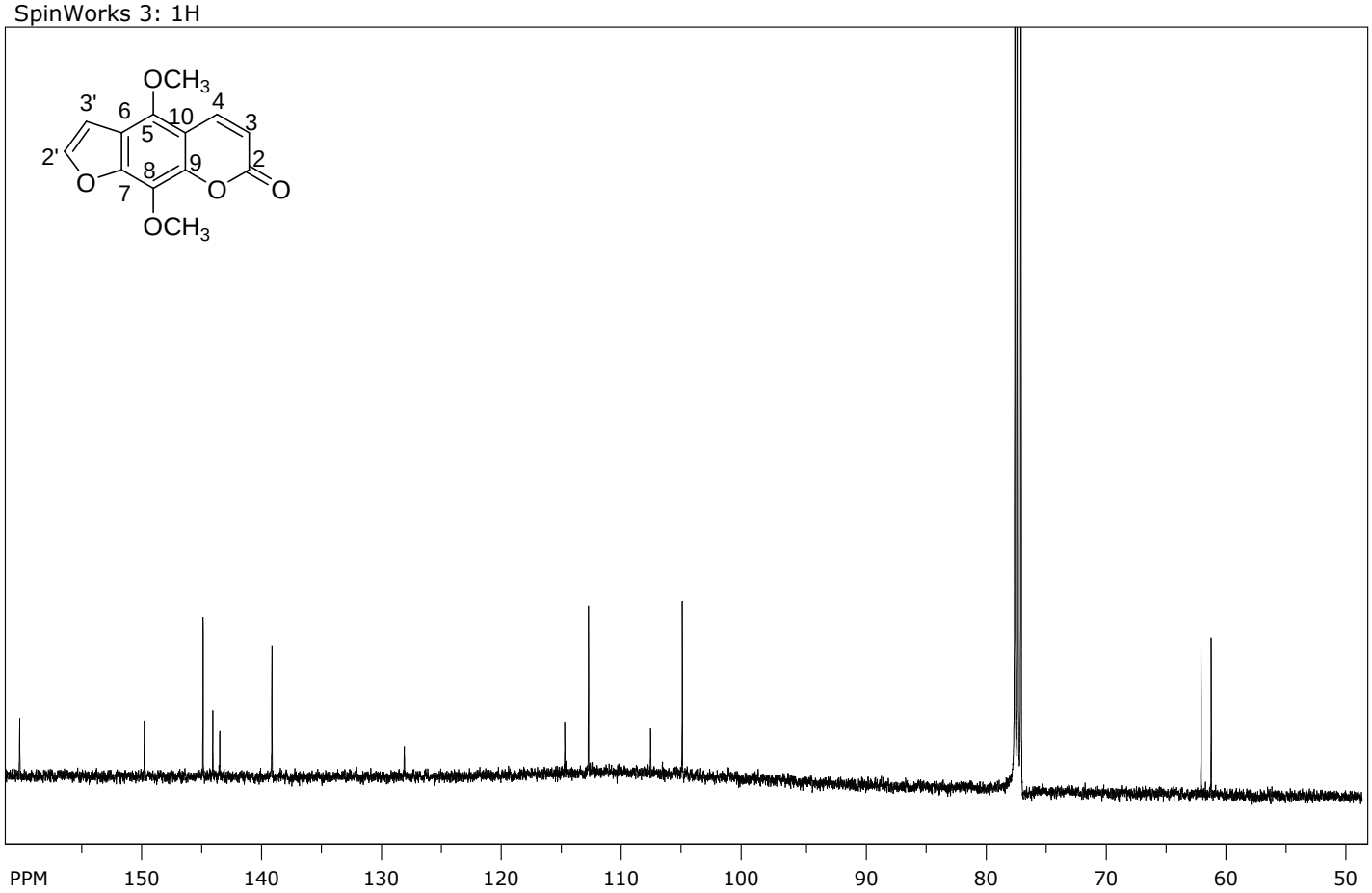


**Figura 35 –** Espectro de RMN de $^{13}C$ (125 MHz) da furanocumarina presente na fração 2, obtido em $CDCl_3$

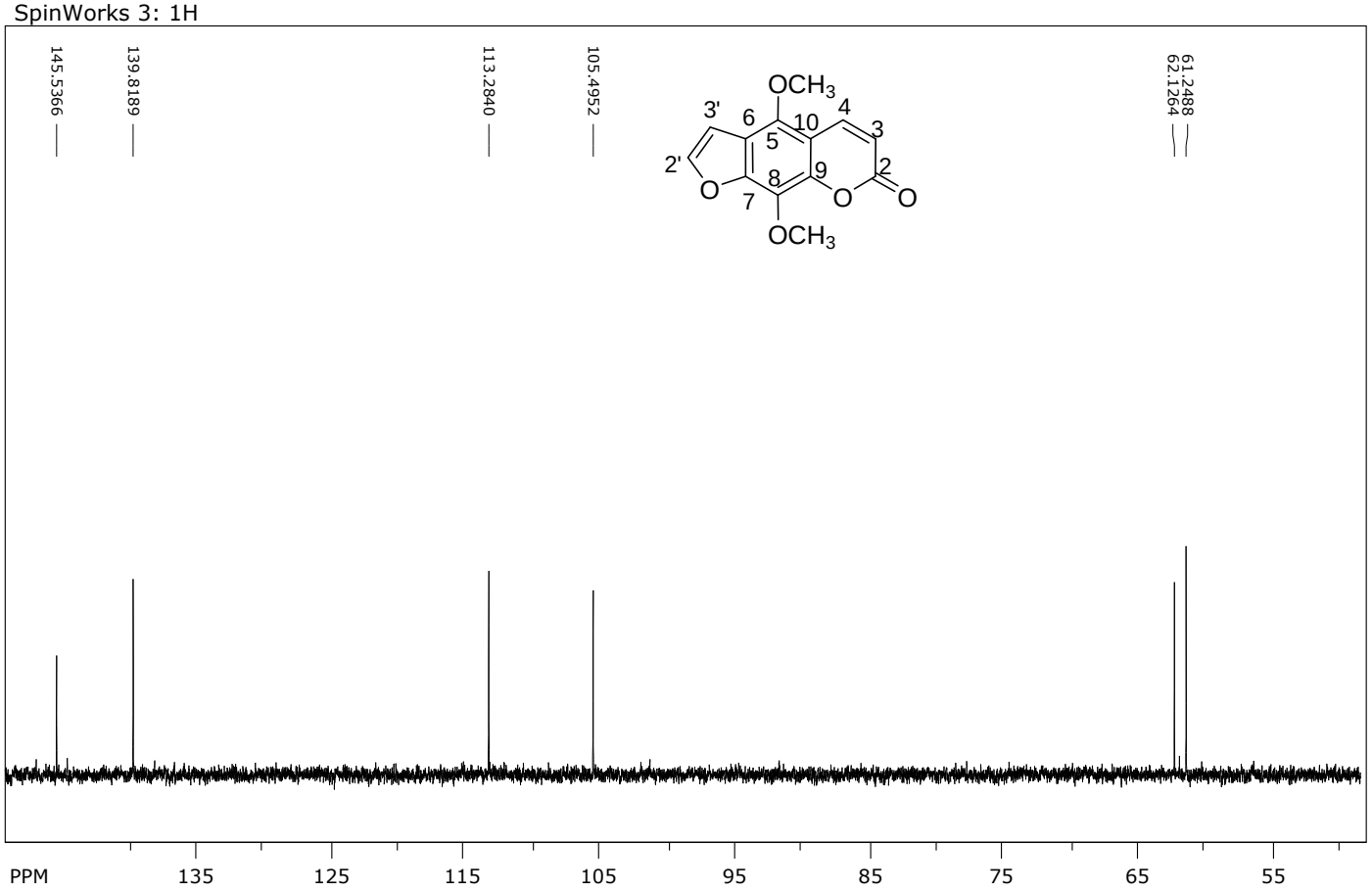


**Figura 36 –** Espectro de DEPT (125 MHz) da furanocumarina presente na fração 2, obtido em $CDCl_3$

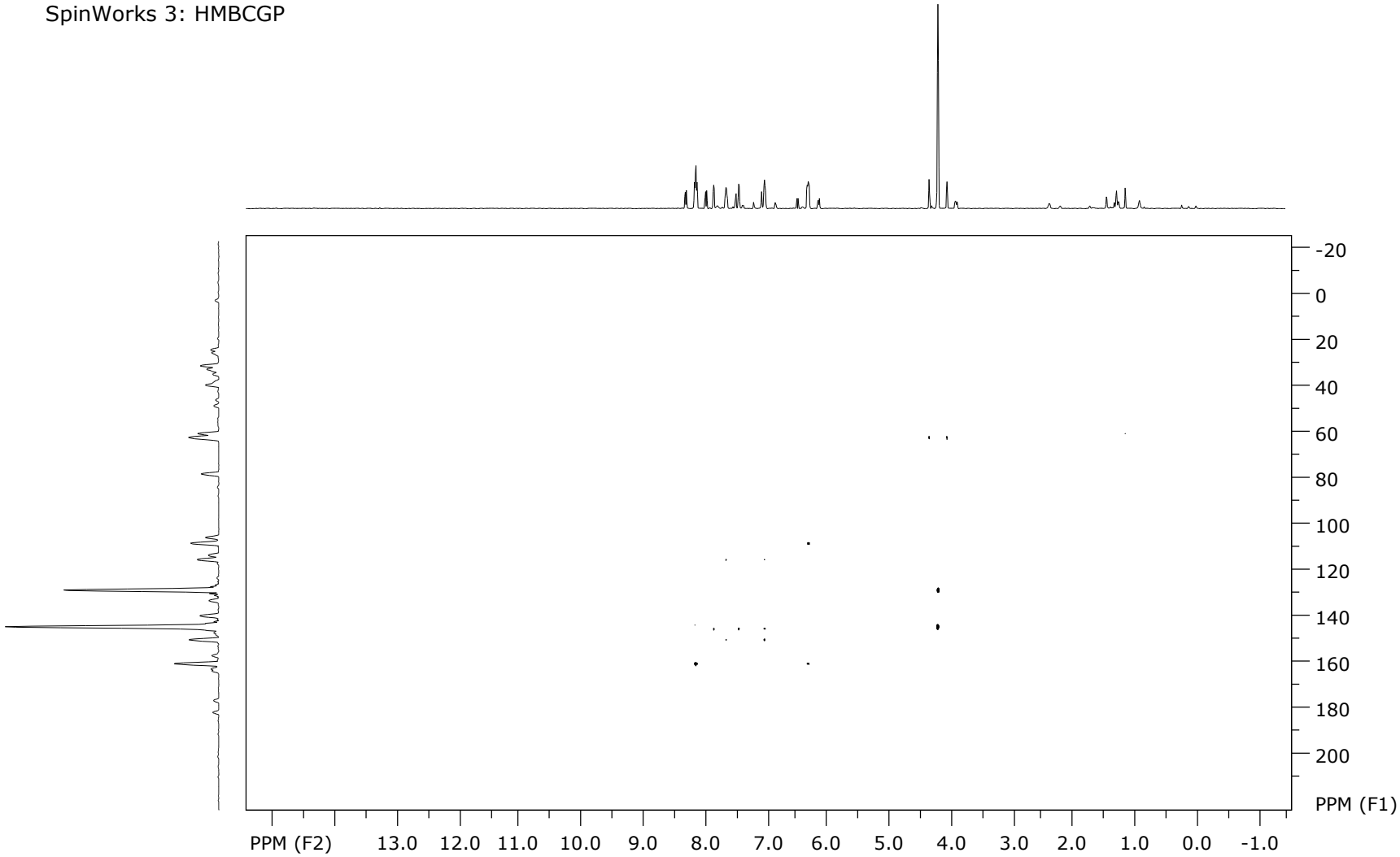


**Figura 37 –** Mapa de contorno HMBC (500 MHz) da furanocumarina presente na fração 2, obtido em $CDCl_3$

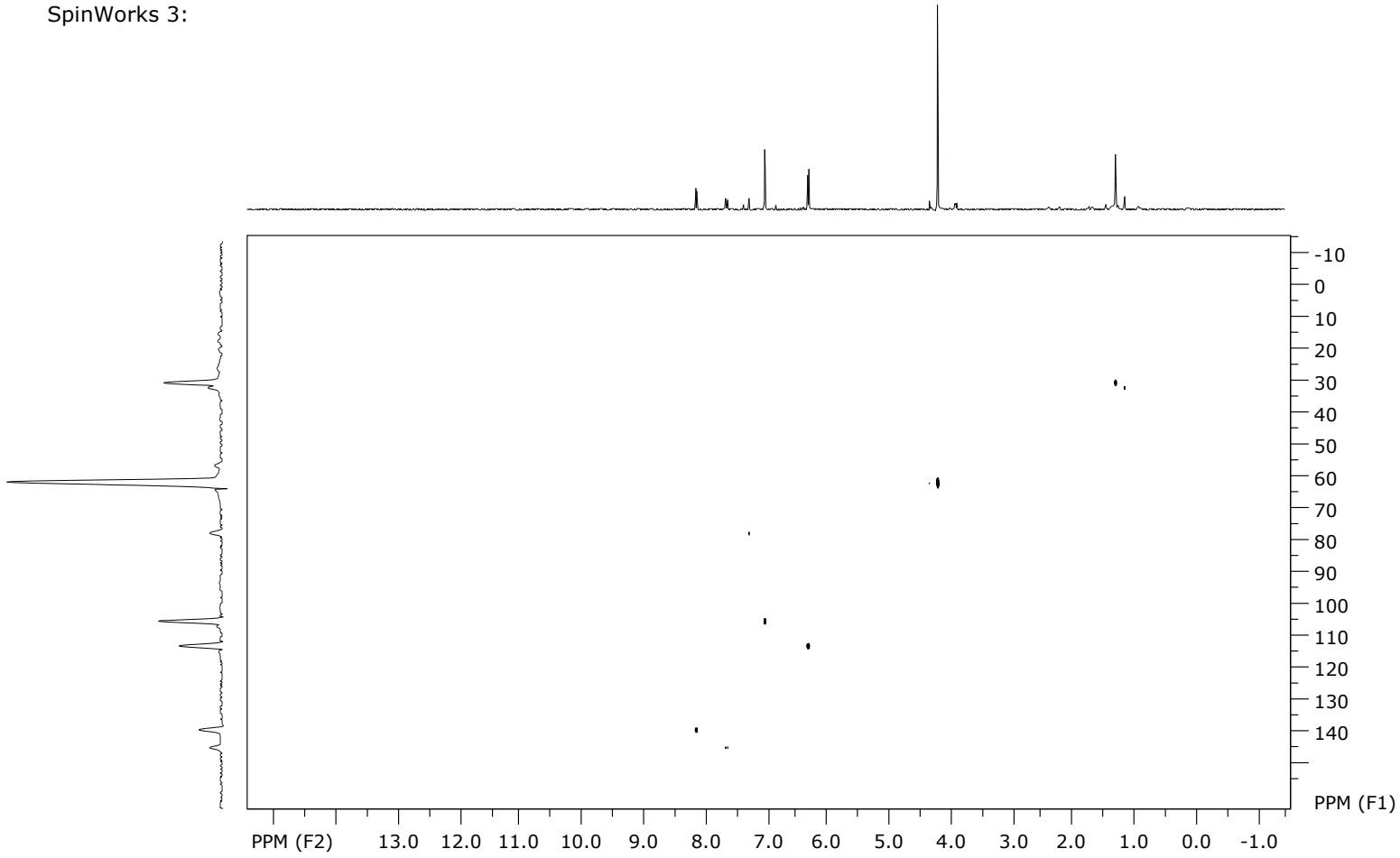


**Figura 38 –** Mapa de contorno HMQC (500 MHz) da furanocumarina presente na fração 2, obtido em $CDCl_3$

## II. Fotobiologia de *C. acutatum*

### 4.6. Avaliação da tolerância à radiação UVB dos conídios de *C. acutatum*

A Figura 39 mostra a sobrevivência relativa (sobrevivência dos conídios expostos em relação aos controles não expostos à radiação) dos conídios das cinco linhagens de *C. acutatum* após exposições a diferentes doses de radiação UVB. Os fungos foram crescidos, no escuro, por cinco dias, e os conídios foram expostos à irradiância de 1800 mW $m^{-2}$ de radiação UVB por 1, 2, 3, 4 e 6 h. A sobrevivência foi inversamente proporcional à dose de radiação. Exposições de apenas duas horas foram suficientes para matar de 50 a 80% dos conídios, dependendo da linhagem. Houve diferença significativa entre a tolerância à radiação das diferentes linhagens. Os conídios da linhagem mais tolerante (CA T-2) apresentaram uma sobrevivência de 7% após 4 h de exposição. Exposições de 6 h mataram 100% dos conídios de todas as linhagens.

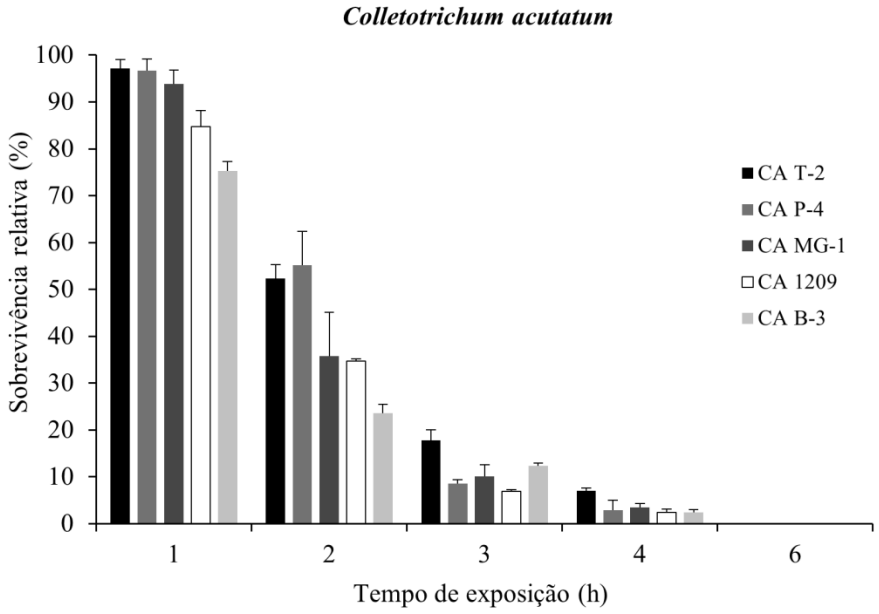


**Figura 39 –** Sobrevivência relativa das linhagens de *Colletotrichum acutatum* após exposição às doses de 6,5, 13, 19,4, 25,9 e 38,9 kJ $m^{-2}$ de UV. Os valores são as médias de três experimentos independentes e a barra indica o desvio padrão da média

## 4.7. Efeito da exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *C. acutatum* na produção de conídios e de mucilagem

O experimento comparou a produção de conídios e de mucilagem de colônias da linhagem CA T-2 crescidas no escuro com a produção por colônias crescidas com fotoperíodo claro/escuro. A produção de conídios por colônias que cresceram expostas à luz visível foi cerca de 1,7 vezes maior do que a produção por colônias que cresceram em completa escuridão ($P$ = 0,0001). A figura 40 mostra o número de conídios produzidos por 0,5 $cm^2$ das colônias.

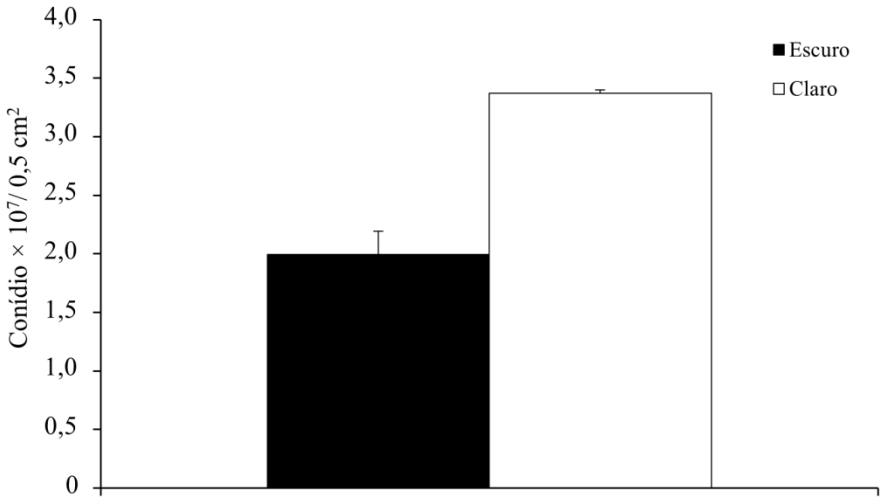


**Figura 40 –** Numero de conídios produzidos por 0,5 $cm^2$ das colônias que cresceram expostas à luz visível (12 h claro/12 h escuro) ou em completa escuridão. Os valores são as médias de contagem de três placas independentes

A Figura 41 mostra a produção de mucilagem por colônias da linhagem CA T-2 que foram expostas à luz visível durante o crescimento e por colônias que cresceram em completa escuridão. A quantidade de mucilagem produzida foi estimada pelo espectro de absorção da solução preparada a partir de uma área conhecida da colônia. Os conídios foram removidos por centrifugação e o espectro de absorção da suspensão diluída (1:10) foi determinado.

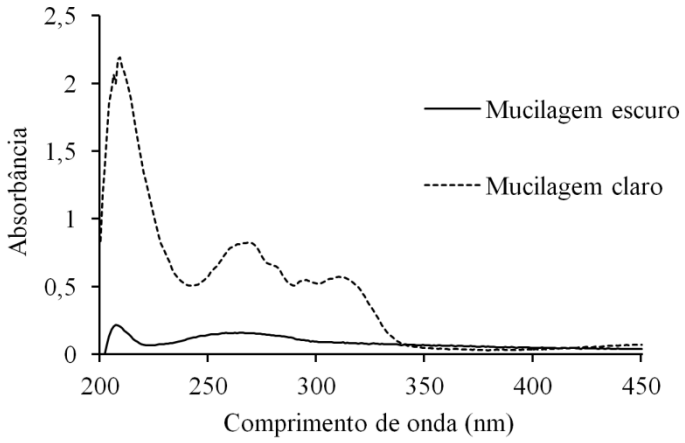


**Figura 41 –** Espectros de absorção da mucilagem produzida em 0,5 $cm^2$ de colônias que cresceram expostas à luz visível (12 h claro/12 h escuro) ou em completa escuridão

### 4.8. Efeito da exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *C. acutatum* na tolerância à radiação UVB dos conídios produzidos

A tolerância à radiação UVB dos conídios das linhagens CA T-2 e CA B-3 de *C. acutatum* produzidos por colônias que cresceram expostas à luz visível (12 h claro: 12 h de escuro) e por colônias que cresceram no escuro são mostradas na Figura 42. Após cinco dias de crescimento, os conídios produzidos foram expostos à radiação UVB por 2 e 3 h (doses de 13 e 19,4 kJ $m^{-2}$ respectivamente). Os conídios produzidos por colônias que cresceram no claro foram significativamente mais tolerantes à radiação UVB do que os conídios produzidos por colônias que cresceram no escuro, em todos os tratamentos. Após 2 h de exposição à radiação UVB, a sobrevivência dos conídios produzidos pela linhagem CA T-2 crescida no claro foi 96,8%, enquanto a sobrevivência dos conídios produzidos por colônias crescidas no escuro foi apenas 49,9% ($P$ = 0,0001). Após três horas de exposição, as sobrevivências foram 68,4% e 24,5% para os conídios produzidos por colônias crescidas no claro e no escuro, respectivamente ($P$ = 0,0001). O mesmo efeito foi observado para a linhagem CA B-3. Após duas horas de exposição, as sobrevivências foram de 94,0% e 40,49% para claro e escuro

respectivamente (*P* = 0,0001). Após três horas, as sobrevivências foram de 58,3% e 22,3% para claro e escuro respectivamente (*P* = 0,0001).

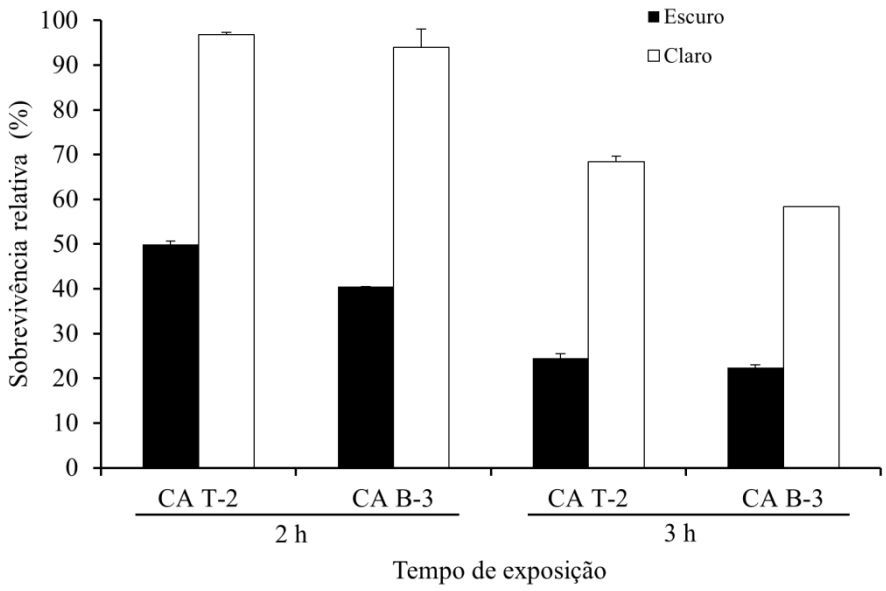


**Figura 42 –** Sobrevivência relativa de conídios das linhagens CA T-2 e CA B-3 de *C. acutatum* produzidos por colônias que cresceram no escuro e com fotoperíodos de 12 h (claro/escuro), após duas e três horas de exposição à radiação UVB. Os valores são as médias de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão das médias

### 4.9. Efeito da exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *C. acutatum, A. nidulans* e *M. acridum*, na tolerância à radiação UVB dos conídios produzidos

As tolerâncias à radiação UVB dos conídios das linhagens CA T-2 de *C. acutatum*, ATCC 10074 de *A. nidulans* e ARSEF 324 de *M. acridum* crescidas no escuro e crescidas com fotoperíodos de 12 h (claro / escuro) são mostradas na Figura 43. Após cinco dias de crescimento das colônias de *C. acutatum* e *A. nidulans* e doze dias de crescimento para as colônias de *M. acridum*, os conídios produzidos foram expostos à radiação UVB por 1, 2 e 3 h (doses de 6,5, 13 e 19,4 kJ $m^{-2}$ respectivamente). Os conídios de *C. acutatum* e *M. acridum* produzidos por colônias que cresceram no claro foram significativamente mais tolerantes à radiação UVB do que os conídios produzidos por colônias que cresceram no escuro, em todos

os tratamentos. A sobrevivência dos conídios, após 1 h de exposição à UVB, produzidos por *C. acutatum* crescido no claro foi 92,87%, enquanto a sobrevivência dos conídios produzidos por colônias crescidas no escuro foi 79,97% (*P* = 0,0001). Após duas horas de exposição, as sobrevivências foram de 81,73% e 51,99%, para os conídios produzidos por colônias crescidas no claro e no escuro, respectivamente (*P* = 0,0001). Após três horas de exposição, as sobrevivências foram de 65,45% e 13,87%, para os conídios produzidos por colônias crescidas no claro e no escuro, respectivamente (*P* = 0,0001). O mesmo efeito foi observado para *M. acridum*. As sobrevivências dos conídios, após 1 h de exposição à UVB, produzidos pela linhagem 324 crescida no claro e no escuro, foram de 85,02% e 62,14% (*P* = 0,0001). Após duas horas de exposição, as sobrevivências foram de 75,01% e 51,99%, para os conídios produzidos por colônias crescidas no claro e no escuro, respectivamente (*P* = 0,0001). Após três horas, as sobrevivências foram de 52,22% e 31,16%, para claro e escuro, respectivamente, (*P* = 0,0001). *A. nidulans* 10074 apresentou um comportamento diferente do observado em *C. acutatum* e *M. acridum*. Os conídios produzidos por colônias que cresceram no escuro foram ligeiramente mais tolerantes do que os conídios produzidos por colônias que cresceram no claro. A sobrevivência dos conídios, após 1 h de exposição à UV, produzidos por colônias crescida no claro e no escuro, foram de 45,47% e 52,25% (*P* = 0,014). Após duas horas de exposição, as sobrevivências foram de 12,45% e 17,00%, para os conídios produzidos por colônias crescidas no claro e no escuro, respectivamente (*P* = 0,093). Após três horas, as sobrevivências foram de 0,41% e 2,33%, para os conídios produzidos por colônias crescidas no claro e no escuro, respectivamente (*P* = 0,470).

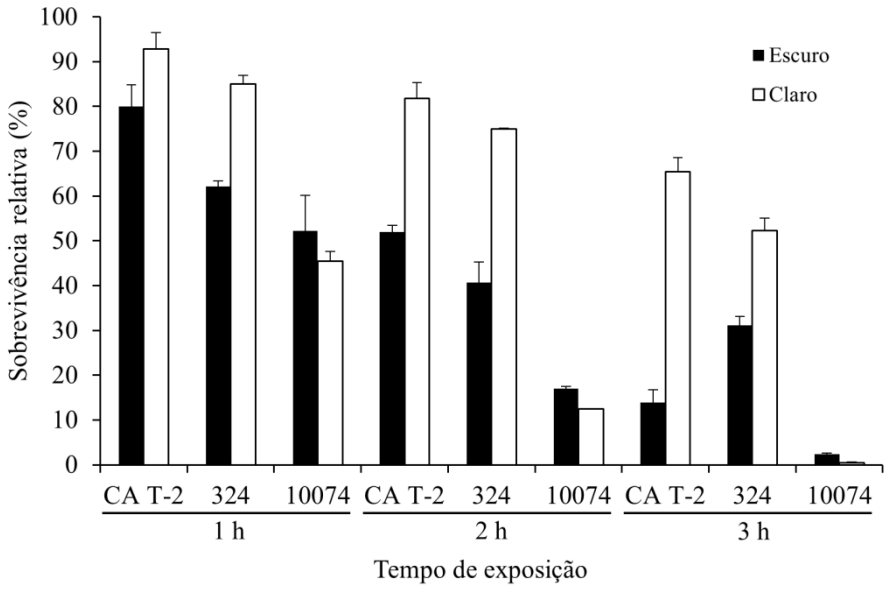


**Figura 43 –** Sobrevivência relativa de conídios das linhagens CA T-2 de *C. acutatum*, ARSEF 324 de *M. acridum* e ATCC 10074 de *A. nidulans*, produzidos por colônias que cresceram no escuro e por colônias que cresceram com fotoperíodos de 12 h (claro/escuro), após uma, duas e três horas de exposição à radiação UVB (doses de 6,5, 13 e 19,4 kJ $m^{-2}$ respectivamente). Os valores são as médias de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão das médias

## 4.10. Exposições de colônias esporuladas de *C. acutatum* à radiação UVB e avaliação da sobrevivência dos conídios

A Figura 44 mostra a sobrevivência relativa dos conídios retirados de colônias com 5 dias de *C. acutatum* após 3, 5, 7 e 9 h de exposição à irradiância de UV de 1800 mW $m^{-2}$ (doses de 19,4, 32,4, 45,4 e 58,3 kJ $m^{-2}$ respectivamente). Foram expostas colônias crescidas no escuro e colônias crescidas com fotoperíodo. Quando imersos na mucilagem produzida pela colônia, os conídios mostraram-se muito mais tolerantes à radiação UVB do que quando expostos em suspensão.

Após 3 h de exposição à radiação UV, a sobrevivência dos conídios foi 73,47% e 42,62% ($P$ = 0,0001) para colônias que cresceram no claro e no escuro, respectivamente. Após 5 h de exposição, as sobrevivências foram de 59,48% e 34,90% ($P$ = 0,0001), após 7 h,

foram de 43,78% e 25,13% (*P* = 0,0001) e após 9 h foram 34,79% e 17,88% (0,0001) para os conídios produzidos por colônias que cresceram no claro e no escuro.

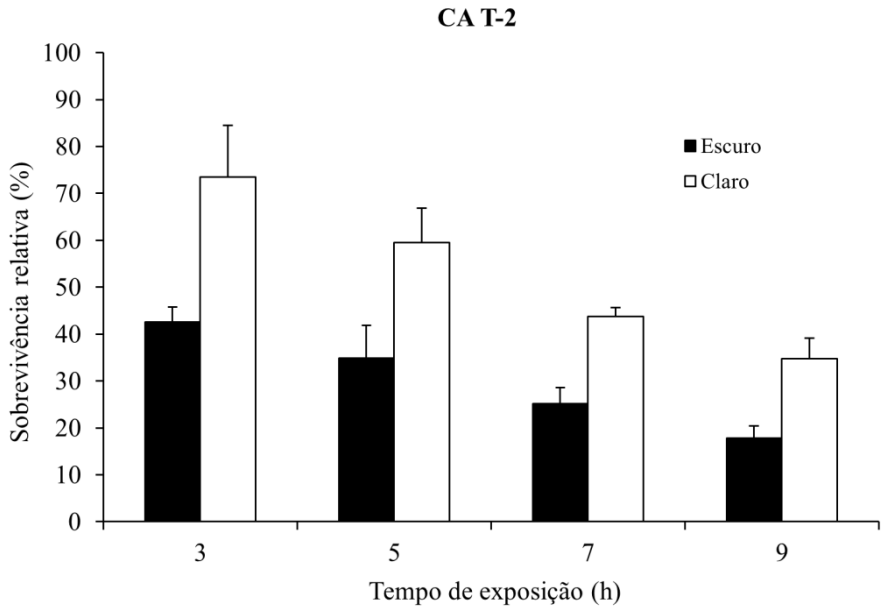


**Figura 44 –** Sobrevivência relativa de conídios da linhagem CA T-2 de *C. acutatum* produzidos por colônias que cresceram no escuro e por colônias que cresceram com fotoperíodos de 12 h (claro/escuro), após três, cinco, sete e nove horas de exposição à radiação UVB (doses de 19,4, 32,4, 45,4 e 58,3 kJ $m^{-2}$ respectivamente). Os valores são as médias de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão das médias

## 5. Discussão

### I - Inativação fotodinâmica de conídios

Embora extremamente promissor, o tratamento fotodinâmico antifúngico encontra-se em fase inicial de desenvolvimento (SMIJS, et al., 2009; HUANG et al., 2010; St. Denis et al., 2011; Dai et al., 2012). Nos últimos anos, o interesse pela área tem aumentado muito, principalmente devido à seleção de fungos tolerantes aos fungicidas atualmente utilizados. Diversos trabalhos têm reportado a IF de fungos com diversos tipos de FS. A maioria desses estudos foi conduzida *in vitro*, com leveduras do gênero *Candida* (JORI et al., 2006; RAGÀS et al., 2010; HUANG et al., 2010, GEROLA et al., 2011; LAM et al., 2011, PRATES et al., 2011b), *Cryptococcus* (SOARES et al., 2011; PRATES et al., 2011a; DOVIGO et al., 2011; RODRIGUES et al., 2012) e com dermatófitos do gênero *Trichophyton* (SMIJS; SCHUITMAKER, 2003; SMIJS et al., 2004; SMIJS et al., 2007; SMIJS et al., 2008; SMIJS et al., 2009; SMIJS; PAVEL, 2011), que são patogênicos para humanos.

Novas aplicações para o TF de fungos, além do uso para o controle de micoses localizadas, precisam ser exploradas. Uma possível aplicação é a utilização do TF para o controle de fungos fitopatogênicos. Informações a respeito da IF de fungos fitopatogênicos são extremamente limitadas e foram obtidas apenas em experimentos *in vitro*. DiCosmo e colaboradores (1982) reportaram a IF, *in vitro*, de *Alternaria alternata*, *Cladosporium variabile*, *Colletotrichum spp*., *Rhizopus nigricans*, *Pythium aphanidermatum* e *Saprolegnia* spp., utilizando derivados de tiofeno de ocorrência natural, como FS e UVA (320-380 nm) como fonte de luz. Bourque e colaboradores (1985) reportaram os efeitos do TF, *in vitro*, de *Fusarium culmorum*, utilizando como FS a fenileptarina (PHT), um acetileno de ocorrência natural produzido por *Bidens pilosa* (Asteraceae) e UVA próxima como fonte de luz. O TF inibiu fortemente a germinação dos macroconídios e o crescimento do micélio do fungo. Vorobey e Pinchuk (2008) descreveram o TF, *in vitro*, de *Fusarium poae* e *Fusarium*

*culmorum*, utilizando protoporfirina IX como FS e uma lâmpada halógena de 150 W $m^{-2}$ como fonte de luz. O TF oxidou componentes celulares, alterou a permeabilidade da membrana e inibiu a germinação dos conídios.

No presente trabalho, foi avaliada a eficácia, *in vitro*, do TF com diversos FS fenotiazínicos, para a inativação de conídios dos fitopatógenos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* e do ascomiceto-modelo *A. nidulans*. Também foram avaliados os efeitos do TF com o psoraleno comercial 8-MOP nas mesmas espécies. Além da escolha do FS mais apropriado para cada espécie e/ou estrutura, a eficácia do TF antifúngico também depende de estudos nos quais são determinados parâmetros mais apropriados para a IF (FUCHS, et al., 2007; GONZALES, et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012). Na etapa inicial deste trabalho, a eficácia do TF foi estimada pela CFM do diferentes FS em cada dose de luz. Quanto menor a CFM, mais eficaz foi considerado o FS. Esse tipo de abordagem foi muito conveniente, pois permitiu avaliar um grande número de tratamentos. Foram avaliados os efeitos dos diversos FS, em várias concentrações, utilizando-se diferentes fontes de luz e várias doses por fonte, nas diversas espécies estudadas. Esse tipo de experimento é mais rápido e tem uma execução mais fácil do que os experimentos nos quais a sobrevivência após o TF é determinada pela contagem das unidades formadoras de colônia.

O TF com os FS fenotiazínicos e com os LED vermelhos mataram os conídios de todas as espécies avaliadas. O S137, que é um novo derivado pentacíclico não comercial do MB, foi o FS mais eficaz para todas as espécies. Dentre as diferentes espécies testadas, os fitopatógenos, *C. acutaum* e *C. gloeosporioides* foram as mais tolerante ao TF com fenotiazínicos. O TF com o 8-MOP e UVB fotoinativou os conídios das duas espécies. *C. acutatum* foi a espécie mais tolerante ao TF com esse FS.

Com base nos resultados obtidos nos experimentos iniciais, foram escolhidos os parâmetros mais apropriados (e.g., intervalo de concentração do FS e intervalo da dose de luz)

para a IF dos conídios e foram realizados experimentos nos quais a eficácia do TF foi determinada pela fração de sobreviventes. Os experimentos foram conduzidos, utilizando-se um arranjo de LED vermelho como fonte de luz, os FS NMBN e S137 (que foram os FS mais eficazes nos experimentos iniciais) nas concentrações de 50 µM e 10 µM, respectivamente, e três doses de luz (15, 20 e 25 J $cm^{-2}$). Foram avaliadas as tolerâncias dos conídios das duas espécies de *Colletotrichum* e de *A. nidulans*. Tanto o TF com o NMBN como com o S137 foram extremamente eficazes contra as três espécies. Na condição mais extrema (maior dose de luz e concentração dos FS) a redução na sobrevivência foi superior a quatro ordens de grandeza.

Diversas características, incluindo o tamanho das células, as características morfológicas e fisicoquímicas da parede celular, e as características fisicoquímicas do FS podem influenciar a seletividade e a eficácia dos diferentes FS (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005b; FUCHS, et al., 2007; HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI, 2006; PAARDEKOOPER, et al., 1992; SMIJS, et al., 2007; SMIJS, et al., 2008; USACHEVA, et al., 2001; USACHEVA, et al., 2003; USACHEVA, et al., 2008). Um dos fatores que podem ter contribuído para o sucesso do TF com os fenotiazínicos é a interação entre as cargas negativas da parede dos diferentes fungos e as cargas positivas desse grupo de FS. Os resultados do potencial zeta confirmaram a presença de cargas negativas na superfície dos conídios das diferentes espécies avaliadas.

A lavagem dos conídios para a remoção do FS não ligado à célula, antes da exposição à luz, não impediu a IF dos conídios com o NMBN e S137, indicando que ambos os FS ligam-se fortemente à célula ou penetram nos conídios. A análise microscópica dos conídios mostrou que os FS NMBN e S137 penetram rapidamente nos conídios de *C. acutatum* e de *C. gloeosporioides* e acumulam-se diferencialmente em diversas vesículas citoplasmáticas, provavelmente corpos lipídicos e/ou vacúolos. As espécies de *Colletotrichum* possuem um

grande número de corpos lipídicos em seus conídios não germinados (MIMS et al. 1995). Experimentos adicionais de co-localização com outros corantes e com microscopia confocal deverão ser feitos para se determinarem as estruturas onde os corantes fenotiazínicos acumulam-se. O 8-MOP também penetrou rapidamente nos conídios e difundiu-se pelo citoplasma. Nas condições avaliadas (e.g. 100 µM do FS e microscopia de fluorescência convencional) não foi observado o acúmulo diferencial do 8-MOP em estruturas citoplasmáticas ou no núcleo dos conídios. A localização do núcleo nos conídios foi determinada pela coloração com DAPI. O núcleo foi intensamente corado pelo DAPI, na concentração 3,5 mM.

Determinar a localização dos FS no interior dos conídios é importante para a compreensão dos mecanismos envolvidos na IF já que os danos provocados pelas espécies reativas estão limitados a moléculas e/ou estruturas intimamente ligadas ao FS. Embora os mecanismos moleculares da IF de fungos que dão origem aos efeitos biológicos ainda não sejam completamente conhecidos, diversos esforços têm sido feitos para entender como os diferentes FS interagem com a célula fúngica, tanto antes como durante a fotossensibilização, e também para determinar os sítios danificados. Tanto a parede celular como a membrana plasmática são carregadas negativamente, o que favorece a ligação de FS catiônicos, como os fenotiazínicos (MB, TBO, NMBN e S137). O TBO liga-se instantaneamente a polifosfatos localizados no lado externo na membrana plasmática de *Saccharomyces fragilis*, após as células serem misturadas com solução do FS (TIJSSEN, et al., 1981). Ito e colaboradores (1977) observaram que o TBO não penetra nas células de *S. cerevisiae* e atribuíram toda a atividade fotodinâmica do FS a espécies reativas geradas no meio extracelular, na superfície externa da célula. Os diferentes FS danificam a célula de leveduras em diferentes sítios celulares. Por exemplo, o TBO e a eosina Y afetam a membrana plasmática, a laranja de acridina e os psoralenos causam danos no DNA, e a tiopironina atua em componentes

citoplasmáticos. Os estudos a respeito da IF de fungos filamentosos e de suas diferentes estruturas especializadas, como conídios, são menos numerosos. Smijs e colaboradores (2009) observaram danos severos na parede celular e deformações, tanto em microconídios, como em hifas de *Trichophyton rubrum*, após o TF letal 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. Gonzales e colaboradores (2010) reportaram a IF de conídios de *A. nidulans* e do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* com os FS MB e TBO. A lavagem para a retirada do FS não ligado reduziu a IF 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.

Embora os fenotiazínicos estejam entre os FS mais estudados (WAINWRIGHT, et al., 2006; WAINWRIGHT, et al., 2007), esse foi o primeiro trabalho que avaliou os efeitos do TF com os FS NMBN e S137 em conídios de fungos. Também foi a primeira avaliação dos efeitos do TF com o 8-MOP em conídios de fitopatógenos.

Não existem informações na literatura a respeito do uso do TF para o controle de fitopatógeno, em condições de campo, nem avaliações dos danos do TF nos hospedeiros vegetais. Nos experimentos de campo, o FS deverá ser ativado pela radiação solar e não por fontes de luz artificiais, como os LED e os lasers, que são utilizadas na terapia fotodinâmica antimicrobiana. Como os FS terão que ser aplicados em áreas extensas, é interessante que sejam baratos e que possam ser obtidos em grande quantidade. Também é fundamental que não provoquem danos significativos no hospedeiro vegetal. Nesse contexto, foi verificada a possibilidade de se obterem FS, como as furanocumarinas e cumarinas, a partir de produtos, subprodutos e resíduos industriais do processamento do limão Tahiti. Nos experimentos iniciais, conduzidos para avaliar a presença desses FS nos principais produtos, subprodutos e resíduos, foi verificado que as cumarinas e/ou as furanocumarinas estão presentes nos óleos

(sub-produtos) e na água da saída da concentradora (resíduo de descarte). Como é produzido em grande quantidade e não tem valor comercial, esse resíduo o mesmo foi escolhido para a extração de cumarinas e furanocumarinas.

Por meio de novas extrações feitas a partir de um volume maior de água da saída da concentradora, foram isoladas duas frações contendo cumarinas e furanocumarinas. Os dados espectroscópicos sugeriram que uma das frações (F1) é constituída pelas cumarinas 7-metoxicumarina ($C_{10}H_8O_3$) e 5,7-dimetoxicumarina ($C_{11}H_{10}O4$), na proporção de 3:1 e a outra fração (F2) é constituída pela furanocumarina isopimpinelina ($C_{13}H_{10}O_5$). O passo seguinte foi avaliar os efeitos do TF com essas duas frações na sobrevivência dos conídios do fitopatógeno *C. acutatum* e de *A. nidulans*. A fim de simular as condições de campo, em vez de lâmpadas, o sol foi utilizado como fonte de luz. As duas frações fotoinativaram os conídios das duas espécies. Na maior concentração avaliada (50 µM), ambas reduziram a sobrevivência dos conídios das duas espécies, em pelo menos quatro ordens de grandeza. Esses valores foram semelhantes aos obtidos com a furanocumarina comercial 8-MOP, que foi utilizado como controle positivo nos experimentos. O sucesso na obtenção de FS eficazes para a IF de espécies de fitopatógenos que causam doenças em *Citrus* a partir de um resíduo da própria indústria citrícola, tem um forte apelo aplicado.

Para a utilização de um FS, tanto para o controle de micoses localizadas em humanos como no campo, para o controle de fitopatógenos, é necessário que esse FS cause poucos danos no hospedeiro. Nós avaliamos os efeitos da aplicação dos FS fenotiazínicos, do 8-MOP e das frações extraídas do limão (F1 e F2) em folhas adultas de mudas de laranja pera (*Citrus sinensis*). Soluções de todos os FS, com concentrações maiores que as necessárias para matar os fungos, foram aplicadas na superfície superior das folhas e as plantas foram expostas a um regime normal de insolação por diversos dias. Nenhum dano ou alteração morfológica nas folhas foi observado em nenhum dos tratamentos. A folha é totalmente recoberta pela

cutícula. Na folha adulta de *Citrus*, a cutícula tem espessura de 4,2 e 3,9 4 µm na face adaxial e abaxial, respectivamente (BOARETTO e colaboradores, 2003). A cutícula apresenta uma composição química complexa, sendo constituída por cutina, polímeros de carboidratos (pectina e celulose) e, principalmente, por ceras. A cera da superfície e a incrustrada na cutina representam 4 e 6% do peso da cutícula. Os hidrocarbonetos representam 40% e os ésteres e álcoois 50% do peso da cera epicuticular. A cutina, que se localiza na parte mais externa da cutícula é 80% constituída por ácidos graxos hidroxilados, unidos por ligações de ésteres que conferem a cutina uma pronunciada carga negativa (BOARETTO e colaboradores, 2003). Caso os FS não a atravessem a cutícula, as células da folha estarão suficientemente distantes do FS para não serem danificadas pelas espécies reativas de oxigênio produzidas durante o TF. A análise histológica de cortes transversais da folha de laranja pera, após a aplicação dos FS fenotiazínicos, mostrou que os corantes não atravessam a cutícula da folha. Novos experimentos com aplicações em uma área maior da planta e em outras estruturas e/ou fases do desenvolvimento ainda devem ser realizados para que haja uma avaliação mais completa dos efeitos do TF na planta.

A obtenção de fotossensibilizadores por meio de um processo de extração simples e economicamente viável a partir de um resíduo sem valor comercial, a comprovação da eficácia desses FS para a IF de fitopatógenos e a constatação da ausência de danos no hospedeiro vegetal viabilizam a continuidade dessa linha de pesquisa.

**II - Fotobiologia de *C. acutatum***

A radiação solar é um dos principais fatores capazes de controlar as populações de fungos, limitando a sobrevivência e a dispersão de espécies patogênicas no meio ambiente (BRAGA et al., 2006). O presente trabalho mostrou que exposições por poucas horas a uma intensidade de radiação de UVB facilmente encontrada no meio ambiente, mesmo em regiões temperadas, são suficientes para inativar os conídios de todas as linhagens de *C. acutatum* avaliadas. Com base nesses resultados, pode-se especular que a radiação solar é um fator importante no controle de populações naturais de *Colletotrichum* spp. Estudos conduzidos com conídios de outros gêneros de ascomicetos, como *Aspergillus* spp. e *Metarhizium* spp. mostraram que além de matar os conídios, exposições subletais à radiação UV provocam danos no DNA que atrasam a germinação e, no caso de espécies patogênicas, podem reduzir a virulência dos conídios sobreviventes (NASCIMENTO et al., 2010). Apesar de todas as linhagens de *Colletotrichum* avaliadas terem sido isoladas no estado de São Paulo, dentro de um intervalo de latitude pequeno, foi observada uma diferença significativa entre a tolerância dos conídios das diferentes linhagens. Estudos realizados com outras espécies de fungos mostraram que a origem geográfica, o hábitat e o hospedeiro do qual a linhagem foi isolada influenciam a tolerância a fatores ambientais geradores de estresse, como a radiação UV e o calor (BRAGA et al., 2001b; RANGEL et al., 2005a,b). Consta nos planos do laboratório a avaliação da tolerância de um número maior de linhagens de *Colletotrichum* spp. isoladas de diferentes hospedeiros e provenientes de uma faixa mais ampla de latitude.

A exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *Colletotricum* aumentou a produção de conídios, a produção de mucilagem e a tolerância à radiação UVB dos conídios produzidos. Os conídios das duas linhagens avaliadas, crescidas no claro, foram, em média, duas vezes mais tolerantes à radiação UVB do que os conídios produzidos por colônias crescidas no escuro. O efeito da exposição à luz visível durante o desenvolvimento varia

muito entre diferentes espécies de fungos e mesmo entre diferentes linhagens da mesma espécie. O presente trabalho também avaliou a exposição à luz visível durante o desenvolvimento de *M. acridum* e *A. nidulans*. O fungo entomopatogênico *M. acridum* apresentou resultado semelhante ao do fitopatógeno *C. acutatum*. *A. nidulans* mostrou um comportamento diferente, já que os conídios produzidos por colônias crescidas no claro não foram mais tolerantes à radiação UVB. O aumento da tolerância à radiação induzido pela luz visível já havia sido observado em outras espécies. Rangel e colaboradores (2011) verificaram que a exposição à luz visível durante o desenvolvimento do fungo entomopatogênico *M. robertsii* aumentou de maneira significativa a tolerância à radiação UVB e ao calor dos conídios, mas não aumentou a produção de conídios.

Os conídios de *C. acutatum* são produzidos em associação com uma matriz hidrossolúvel composta principalmente por polissacarídeos e proteínas (NICHOLSON; MORAES, 1980). No presente trabalho, nos experimentos que avaliaram a tolerância à radiação UV, os conídios foram suspensos em solução de Tween, de modo que a mucilagem que os envolve foi removida durante o preparo das suspensões. Como o aumento na tolerância, induzido pela luz, foi observado em conídios nos quais a mucilagem foi removida é evidente que outros fatores celulares induzíveis (além do possível efeito fotoprotetor da mucilagem) também estão envolvidos na tolerância à radiação solar em *C. acutatum*. A indução de fotoprotetores pela luz visível, como as micosporinas, foi observada em diversas espécies de fungos, incluindo-se as espécies do gênero *Colletotrichum* (BANDARANAYAKE, 1998; OREN; GUNDE-CIMERMAN, 2007).

A análise do espectro de absorção mostrou que a mucilagem apresenta forte absorção na região do UV do espectro. Isso permite especular que a mesma funcione como um filtro solar e que os conídios, quando imersos na mucilagem, apresentem uma maior tolerância à radiação e consequentemente uma maior persistência ambiental. Os resultados mostraram que

os conídios imersos na mucilagem foram muito mais tolerantes à radiação UV (BANDARANAYAKE, 1998; OREN; GUNDE-CIMERMAN, 2007). Estudos conduzidos com outras espécies de fungos fitopatogênicos mostraram que a matriz está envolvida na tolerância dos conídios à radiação solar, a variações de temperatura e à dissecação (MONDAL; PARBERY, 2005).

## 6. Referências bibliográficas

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, p. 656-669, 2001.

AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L. W.; MITCHELL, D. J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology,** St. Paul, v. 82, n. 11, p. 1377-1382, 1992.

AKTAS, E.; YIGIT, N. Determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus* spp. responsible for otomycosis by E-test method. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 19, p. 122-125, 2009.

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

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

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.

BANDARANAYAKE, W. M. Mycosporines: are they nature's sunscreens? **Natural Product Reports**, view online, p. 159-172, 1998.

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.

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.

BINNS, S. E.; PURGINA, P. B.; BERGERON, C.; SMITH, M. L.; BALL, L.; BAUM, B. R.; ARNASON, J. T. Light-mediated antifungal activity of *Echinacea* extrats. **Planta Médica**, v. 66, p. 241-244, 2000.

BLISS, J. M.; BIGELOW, C. E.; FOSTER, T. H.; HAIDARIS, C. G. Susceptibility of *Candida s*pecies to photodynamic effects of photofrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2000-2006, 2004.

BOGUCKA-KOCKA, A.; KRZACZEK, T. The furanocoumarins in the roots of *Heracleum sibiricum* L. *Acta Poloniac Pharmaceutica*, **Drug Research**, v.60, n.5, 401-403, 2003.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C.; LATGE, J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied and environmental microbiology**, v. 54(7), p. 1795-1805, 1988.

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

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae.* **Photochemistry and Photobiology,** v. 74, p. 734-739, 2001b.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology,** v. 78, p. 98-108, 2001c.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Effects of UVB irradiance on conidia and germinantes of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae:* A study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiology,** v. 73, p. 140-146, 2001a.

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82(2), p. 418-422, 2006.

BRAGA, G. U.; RANGEL, D. E.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. **Mycologia**, v.94, p.912-920, 2002.

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.

DAGUE, E., DELCORTE, A., LATGE´ J.-P.; DUFRÊNE, Y. F. Combined use of atomic force microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, and secondary ion mass spectrometry for cell surface analysis. **Langmuir**, v. 24, p. 2955–2959. 2008.

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.; HUANG, Y-Y.; HAMBLIN, M. R.; Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 6, p. 170-188, 2009.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic inactivation of *Bacillus* Spores, mediated by phenothiazinium dyes. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 71, p. 6918-6925, 2005a.

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, 2005b.

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 systemms for photoinactivation of microorganisms. **Journal of Brazilian chemical society**, v. 21, n. 4, p. 694-700, 2010

DiCOSMO, F.; NORTON, R.; TOWERS, G. H. N. Photoinduced fungicidal activity elicited by naturally occurring thiophene derivaties. **Pestic. Sci.** v. 327, p. 9-11. 1982.

DOMINGUES, R. J.; TÖFOLI, J. G.; OLIVEIRA, S. H. F.; GRACIA JÚNIOR, O. Controle químico da flor preta (*Colletotrichum acutatum* simmonds) do morangueiro em condições de campo. **Arq. Inst. Biol.**, v. 68, p. 37-42, 2001

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.

ENOCH, D. A.; LUDLAM, H. A.; BROWN, N. M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **Journal of Medical Microbiology,** v.55, p.809-818, 2006.

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**, Botucatu, v. 28, n. 4, p. 325-330, 2002.

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.

GALAGAN, J. E.; CALVO, S. E.; CUOMO, C.; MA, L. J.; W. J. R.; BATZOGLOU, S.; LEE, S. I.; BASTÜRKMEN, M.; SPEVAK, C. C.; CLUTTERBUCK, J.; KAPITONOV, V.; JURKA, J.; SCAZZOCCHIO, C.; FARMAN, M.; BUTLER, J.; PURCELL, S.; HARRIS, S.; BRAUS, G. H.; DRAHT, O.; BUSCH, S.; D'ENFERT, C.; BOUCHIER, C.; GOLDMAN, G. H.; BELL-PEDERSEN, D.; GRIFFITHS-JONES, S.; DOONAN, J. H.; YU, J.; VIENKEN, K.; PAIN, A.; FREITAG, M.; SELKER, E. U.; ARCHER, D. B.; PEÑALVA, M. Á.; OAKLEY, B. R.; MOMANY, M.; TANAKA, T.; KUMAGAI, T.; ASAI, K. MACHIDA, M.; NIERMAN, W. C.; DENNING, D. W.; CADDICK, M.; HYNES, M.; PAOLETTI, M.; FISCHER, R.; MILLER, B.; DYER, P.; SACHS, M. S.; OSMANI, S. A.; BIRREN, B. W. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**. v.438, p.1105-1115, 2005.

GAO F., LI H. R., YANG Y.Y. Influence of the molecular structure and medium on the absorption and emission character of ketocoumarin derivatives and probability of as fluorescence probes. Dyes Pigm, v. 47, p.231–238, 2000.

GARCIA-PAJÓN, C. M.; COLLADO, I. G. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. **Natural Product Reports**, v. 20, p. 426-431, 2003.

GEROLA, A. P.; SANTANA, A.; FRANÇA, P. B.; TSUBONE, T. M.; OLIVEIRA, H. P. M.; CAETANO, W.; KIMURA, E.; HIOKA, N. Effects of metal and the phytyl chain on chlorophyll derivatives: Physicochemical evaluation for photodynamic inactivation of microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 884-894, 2011.

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

GIRARDIN, H.; PARIS, S.; RAULT, J.; BELLON-FONTAINE, M. N.; LATGÉ, J. P. The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus* conidia. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29(6), p. 364-369, 1999.

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.

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.

HANAWA, F.; OKAMOTO, M.; TOWERS, G. H. N. Antimicrobial DNA-binding photosensitizers from the common rush, *Juncus effusus*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, p. 51-56, 2002.

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 Mol Biol.,** v. 635, p. 155-173, 2010.

ISTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA, IBGE. **Produção agrícola**: lavouras. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Acessado no dia 4 de jullho de 2011.

ITO, T. Toluidine blue: The mode of photodynamic action in yeast cells. **Photochem. Photobiol.,** v. 25, p. 47–53. 1977.

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.

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

**KIHARA, J.; MORIWAKI, A.; ITO, M.; ARASE, S.; HONDA, Y.** Expression of THR1, a 1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase gene involved in melanin biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*, is enhanced by near-ultraviolet radiation. **Pigment Cell Res**. v. 17, p. 15-23, 2004.

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.

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.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. COLETTA FILHO, H. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Eds). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico/Fundag, p.509-566, 2005.

LEÃO, R. A. C.; DE MORAES, P. F.; PEDRO, M. C. B. C.; COSTA, P. R. R. Synthesis of coumarins and neoflavones through zinc chloride catalyzed hydroarylation of acetylenic esters with the phenols. **Synthesis**, v. 22, p. 3692-3696, 2011.

LEHR, G. J.; BARRY, T. L.; FRANOLIC, J. D.; PETZINGER, G.; SCHEINER, P. LC determination of impurities in methoxsalen drug substance: isolation and identification of isopimpinellim as a major impurity by atmospheric pressure chemical ionization LC/MS and NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 627-637, 2003.

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.

MAISCH, T., SZEIMIES, R. M.; JORI, G.; ABELS, C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.3, p.907-917, 2004.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agronômicas**, Recife, v. 3, p. 170-179, 2006.

MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A.; CLAY, R. P.; NICHOLSON, R. L. Ultrastructure of conidia and the conidium aging process in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola.* **International Journal of Plant Sciences**, v. 156, p.9-18, 1995.

MONDAL, A. H.; PARBERY, D. G. The protective role of the spore matrix of *Colletotrichum musae* during rehydration and exposure to extreme temperatures and UV radiation. **Australian Plant Pathology**, v. 34, p 229-235, 2005.

MONTGOMERY, D.C. Design na analysis of experiments. 5ª edição, ed. John Wiley & Song, p. 557, 2001.

NASCIMENTO, É.; SILVA, S. H.; MARQUES, E. R.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. L. Quantification of cyclobutane pyrimidine dimers induced by UVB radiation in conidia of the fungi *Aspergillus fumigates, Aspergillus nidulans, Metarhizium acridum* and *Metarhizium robertsii.* **Photochemistry and photobiology,** v. 86, p. 1259-1266, 2010.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; PEREIRA, F. C.; KALAKI, R. B. O Retrato da Citricultura Brasileira. **1. ed. Ribeirão Preto**, v. 1., p. 137, 2010.

NICHOLSON, R. L.; MORAES, W. B. C. Survival of *Colletotrichum graminicola:* inportance of the spore matrix. **Ecology and Epidemiology**, v. 70, n° 3, p. 255-261 1980.

NIERMAN, W. C.; PAIN, A.; ANDERSON, M. J.; WORTMAN, J. R.; KIM, H. S.; ARROYO, J.; BERRIMAN, M.; ABE, K.; ARCHER, D. B.; BERMEJO, C.; BENNETT, J.; BOWYER, P.; CHEN, D.; COLLINS, M.; COULSEN, R.; DAVIES, R.; DYER, P. S.; FARMAN, M.; FEDOROVA, N.; FEDOROVA, N.; FELDBLYUM, T. V.; FISCHER, R.; FOSKER, N.; FRASER, A.; GARCÍA, J. L.; GARCÍA, M. J.; GOBLE, A.; GOLDMAN, G. H.; GOMI, K.; GRIFFITH-JONES, S.; GWILLIAM, R.; HAAS, B.; HAAS, H.; HARRIS, D.; HORIUCHI, H.; HUANG, J.; HUMPHRAY, S.; JIMÉNEZ, J.; KELLER, N.; KHOURI, H.; KITAMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; KONZACK, S.; KULKARNI, R.; KUMAGAI, T.; LAFTON, A.; LATGÉ, J. P.; LI, W.; LORD, A.; LU, C.; MAJOROS, W. H.; MAY, G. S.; MILLER, B. L.; MOHAMOUD, Y.; MOLINA, M.; MONOD, M.; MOUYNA, I.; MULLIGAN, S.; MURPHY, L.; O'NEIL, S.; PAULSEN, I.; PEÑALVA, M. A.; PERTEA, M.; PRICE, C.; PRITCHARD, B. L.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; RAWLINS, N.; RAJANDREAM, M. A.; REICHARD, U.; RENAULD, H.; ROBSON, G. D.; CÓRDOBA, S. R.; RODRÍGUEZ-PEÑA, J. M.; RONNING, C. M.; RUTTER, S.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, M.; SÁNCHEZ-FERRERO, J. C.; SAUNDERS, D.; SEEGER, K.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAKEUCHI, M.; TEKAIA, F.; TURNER, G.; ALDANA, C. R. V.; WEIDMAN, J.; WHITE, O.; WOODWARD, J.; YU, J. H.; FRASER, C.; GALAGAN, J. E.; ASAI, K.; MACHIDA, M.; HALL, N.; BARRELL, B.; DENNING, D. W. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v.438, p.22-29, 2005.

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.

OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? **FEMS Microbiol. Lett.** v. 269, p. 1-10, 2007.

PAARDEKOOPER, 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. **Biochim. Biophys. Acta.** v.11 (08), p. 86-90, 1992.

PANDEY, R. R.; ARORA, D. K.; DUBEY, R. C. Effect of environmental condition and inoculums density on infection of guava fruits by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycopathologia**, v. 137, p. 165-172, 1997.

PARIS S.; DEBEAUPUIS, J. P.; CRAMERI, R.; CAREY, M.; CHARLÈS, F. PRÉVOST, M. C.; SCHMITT, C.; PHILIPPE, B.; LATGÉ, J. P. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69(3), p. 1581-1588, 2003.

PARNELL, M.; BURT, P. J. A.; WILSON, K. The influence of exposure to ultraviolet in simulated sunlight on ascospores causing Black Sigatoga disease of banana and plantain. **International Journal of Biometeorology,** v. 42, p. 22-27,1998.

PAUL, N. D.; RASANAYAGAM, S.; MOODY, S. A.; HATCHER, P. E.; AYRES, P. G. the role of interactions between trophic levels in determining the effects of UV-B on terrestrial ecosystems. **Plant Ecology,** v. 128, p. 297-308, 1997.

PRATES, R. A., HAMBLIN, M. R.; KATO, I. T.; FUCHS, B.; MYLONAKIS, E.; RIBEIRO M. S.; TEGOS G. *Cryptococcus neoformans* capsule protects cell from oxygen reactive species generated by antimicrobial photodynamic inactivation. **Proc. of SPIE**, v. 7887, p. 1-9. 2011a.

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 Chemoterapy,** v. 4, p. 1-8, 2011b.

QUAITE, F. E.; SUTHERLAND, B. M.; SUTHERLAND, J. C. Action spectrum for DMA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. **Nature,** v. 358, p. 576-578, 1992.

RAGÀS, X.; DAI, I.; TEGOS, G. P.; AGUT, M.; NONELL, S.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenotiazinium dyes: in vitro and in vivo studies. **Lasers Surg. Med.** v. 42, p. 384-390, 2010.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ANDERSON, A. J. ; ROBERTS, D. W. Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed and morphology of Metarhizium anisopliae var. acridum conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, Estados Unidos, v. 90, n. 1, p. 55-58, 2005a.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in conidial thermotolerance of Metarhizium anisopliae isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, Estados Unidos, v. 88, n. 2, p. 116-125, 2005b.

RANGEL, D. E. N.; FERNANDES, E. K. K.; BRAGA, G. U. L.; ROBERTS, D. W. Visible light during mycelial growth and conidiation of Metarhizium robertsii produces conidia with increased stress tolerance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 315, p. 81-86, 2011.

RIBEIRO C. V. C., KAPLAN M. A. C. Tendências Evolutivas de Famílias Produtoras de Cumarinas em Angiospermae. **Quim Nova,** v. 25, p. 533-538, 2002.

RODRIGUES, G. B.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C. BRAGA, G. U. L. *In vitro* photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans* melanized cells with chloroaluminum phtalocyanine nanoemulsion. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 440-447, 2012.

SAS Institute Inc., *SAS/STAT® User's Guide, Version 9.0*, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2003.

SCHIAVE, L. A.; PEDROSO, R. S.; CANDIDO, R. C.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. L. Variability in UVB tolerances of melanized and nonmelanized cells of *Cryptococcus neoformans* and *C. laurentii*. **Photochemistry and Photobiology,** v. 85, p. 205-213, 2009.

SERRA, I. M. R. S.; COELHO, R. S. B.; MENEZES, M. Caracterização fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multispóricos de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Summa Phytopathologica,** v. 34, n 2, p. 113-120, 2008.

SETZER, N. W.; VOGLER, B.; BATES, R. B.; SCHMIDT, J. M.; DICUS, C. W.; NAKKIEW, P.; HABER, W. A. HPLC-NMR/HPLC-MS Analysis of the bark extract of *Stauranthus perforates.* **Phytochemical Analysis**, v. 14, p. 54-59, 2003.

SHAH, F. A.; ALLEN, N.; WRIGHT, C. J.; BUTT, T. M. Repeated *in vitro* subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276(1), p. 60-66, 2007.

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; LEMOS, O. L.; BOMFIM, M. P.; BOMFIM, A. A.; ESQUIVEL, G. L.; BARRETO A. P. P.; JOSÉ, A. R. S.; DIAS, N. O.; TAVARES, G. M. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n 1, p. 131-133, 2006.

SMIJS, T. G. M., PAVEL, S.; TALEBI, M.; BOUWSTRA, J. A. Preclinical studies with 5,10,15-tris(4-mathylpyridinium)-20-phenyl-[21*H*, 23*H*]-porphine trichloride for the photodynamic treatment of superficial mycoses caused by *Thrichophyton 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. **J. Antimicrob. Chemother,** 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. **Med. Mycol**, v. 46, p. 315–325, 2008.

SMIJS, T. G.; SCHUITMAKER, H. J. Photodynamic inactivation of the Dermatophyte *Trichopyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v.77, p.556-560, 2003.

SMIJS, T. G.; VAN DER HASS, R. N.; LUGTENBURG, J.; LIU, H.; DE JONG, R. L.; SCHUITMAKER, H. J. Photodynamic treatment of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its microconidia with porphyrin photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology,** v.80, p.197-202, 2004.

SOARES, B. M.; ALVES, O. A.; FERREIRA, M. V. L.; AMORIM, J. C. F.; SOUSA, R. G.; SILVEIRA, L. B.; PRATES, R. A.; ÁVILA, T. V.; BALTAZAR, L. M.; SOUZA, D. G.; SANTOS, D. A.; MODOLO, L. V.; CISALPINO, P. S.; PINOTTI, M. *Cryptococcus gattii*: *in vitro* susceptibility to photodynamic inactivation. **Photochemistry and. Photobioliology,** v. 87, p. 357-364 2011.

SOUKOS, N. S.; FYVIE, L. A. X.; HAMBLIN, M. R.; SOCRANSKY, S. S.; HASAN, T. Targeted antimicrobial photochemoterapy. **Antimicrobial Agents and Chemoteraphy**, v. 42, p. 2595-2601, 1998.

SPÓSITO, M. B.; YAMAMOTO, P. T.; BELASQUE JUNIOR, J.; BASSANEZI, R. B. LOPES, S. A. Doenças fúngicas em citros. **Cultivar Hortaliças e Frutas**, 2006.

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.

TEGOS, G. P.; DEMIDOVA, T. N.; ARCILA-LOPES, D.; LEE, H.; WHARTON, T.; GALI, H.; HAMBLIN, M. R. Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. **Chemistry & Biology**, v. 12, p. 1127-1135, 2005.

TEGOS, G. P.; MASAGO, K.; AZIZ, F.; HIGGINBOTHAM, A.; STERMITZ, F. R.; HAMBLIN, M. R. Inibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52(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. **Biochim. Biophys. 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**, St. Paul, v. 78, n. 4, p. 329-334, 1994.

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 phenotiazine 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.

VALK, H. A.; KLAASSEN, C. H. W.; MEIS, J. F. G. M. Molecular typing of *Aspergillus* species. **Mycoses**, v. 51, p.463-76, 2008.

VENEZIO, R. F.; VINCENZO, C. D.; SHERMAN, R.; REICHMAN, M.; ORIGITANO, T. C.; THOMPSON, K.; REICHMAN, O. H. Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 151, p. 166-169, 1985.

VIJILA, C., RAMALINGAM, A., PALANISAMY, P. K., MASILAMANI, V. Proper Choice of XC Functionals and Calculations of Fluorescence-Emitting Energies for Coumarin Derivatives. **Spectrochim. Acta A**, v. 57, p. 491, 2001.

VOROBEY, 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. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. **Chemical Society Rewiews**, p. 351-359, 1996.

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

WAINWRIGHT, M.; BYRNE, M. N.; GATTRELL, M. A. phenothiazinium-based photobactericidal materials. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,** v. 84, p. 227-230, 2006.

WAINWRIGHT, M.; MOHR, H.; WALKER, W. H. Phenotiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,** v. 86, p. 45-58, 2007.

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.

WILLOCQUET, L.; COLOMBET, D.; ROUGIER, M.; FARGUES, J.; CLERJEAU, M. Effects of radiation, especially ultraviolet B, on conidial germination and mycelia growth of grape powdery mildew. **European Journal of Plant Pathology,** v. 102, p. 441-449, 1996.

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.

XU, Y.; YOUNG, M. J.; BATTAGLINO, R. A.; MORSE, L. R.; FONTANA, C. R.; PAGONIS, T. C.; KENT, R.; SOUKOS, N. S. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 1, p. 1567-1572, 2009.

ZEINA, B.; GREENMAN, J.; PURCELL, W. M.; DAS, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 144, p. 274-278, 2001.

# APÊNDICES

**APÊNDICE A –** Comparações entre as médias das frações de sobrevivência de células das espécies de *Colletotrichum* e *A. nidulans* com o FS NMBN. Os conídios foram incubados com o FS e, a seguir, lavados ou não para retirada do excesso de FS, antes de serem expostas às diferentes doses de luz (LED600)

| **Comparações** | **Diferença entre as médias** | ***P* – Valor** |
|---|---|---|
| (lavado x não lavado) 15 J $cm^{-2}$ *C. acutatum* | 0,00 | 0,99 |
| (lavado x não lavado) 20 J $cm^{-2}$ *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (lavado x não lavado) 25 J $cm^{-2}$ *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 20 J $cm^{-2}$) lavado *C. acutatum* | 0,00 | 0,99 |
| (15 x 25 J $cm^{-2}$) lavado *C. acutatum* | 0,00 | 0,99 |
| (20 x 25 J $cm^{-2}$) lavado *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 20 J $cm^{-2}$) não lavado *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 25 J $cm^{-2}$) não lavado *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (20 x 25 J $cm^{-2}$) não lavado *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (lavado x não lavado) 15 J $cm^{-2}$ *C. gloeosporioides* | 0,00 | 0,99 |
| (lavado x não lavado) 20 J $cm^{-2}$ *C. gloeosporioides* | 0,00 | 1,00 |
| (lavado x não lavado) 25 J $cm^{-2}$ *C. gloeosporioides* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 20 J $cm^{-2}$) lavado *C. gloeosporioides* | 0,00 | 0,99 |
| (15 x 25 J $cm^{-2}$) lavado *C. gloeosporioides* | 0,00 | 0,99 |
| (20 x 25 J $cm^{-2}$) lavado *C. gloeosporioides* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 20 J $cm^{-2}$) não lavado *C. gloeosporioides* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 25 J $cm^{-2}$) não lavado *C. gloeosporioides* | 0,00 | 1,00 |
| (20 x 25 J $cm^{-2}$) não lavado *C. gloeosporioides* | 0,00 | 1,00 |
| (lavado x não lavado) 15 J $cm^{-2}$ *A. nidulans* | 0,00 | 0,99 |
| (lavado x não lavado) 20 J $cm^{-2}$ *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |

**Continua**

**Conclusão**

| | | |
|---|---|---|
| (lavado x não lavado) 25 J $cm^{-2}$ *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 20 J $cm^{-2}$) lavado *A. nidulans* | 0,00 | 0,99 |
| (15 x 25 J $cm^{-2}$) lavado *A. nidulans* | 0,00 | 0,98 |
| (20 x 25 J $cm^{-2}$) lavado *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 20 J $cm^{-2}$) não lavado *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 25 J $cm^{-2}$) não lavado *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |
| (20 x 25 J $cm^{-2}$) não lavado *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |

**APÊNDICE B –** Comparações entre as médias das frações de sobrevivência de células das espécies de *Colletotrichum* e *A. nidulans* com o FS S137. Os conídios foram incubados com o FS e, a seguir, lavados ou não para retirada do excesso de FS, antes de serem expostas às diferentes doses de luz (LED600)

| **Comparações** | **Diferença entre as médias** | ***P* – Valor** |
|---|---|---|
| (lavado x não lavado) 15 J $cm^{-2}$ *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (lavado x não lavado) 20 J $cm^{-2}$ *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (lavado x não lavado) 25 J $cm^{-2}$ *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 20 J $cm^{-2}$) lavado *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 25 J $cm^{-2}$) lavado *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (20 x 25 J $cm^{-2}$) lavado *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 20 J $cm^{-2}$) não lavado *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 25 J $cm^{-2}$) não lavado *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (20 x 25 J $cm^{-2}$) não lavado *C. acutatum* | 0,00 | 1,00 |
| (lavado x não lavado) 15 J $cm^{-2}$ *C. gloeosporioides* | 0,00 | 0,99 |
| (lavado x não lavado) 20 J $cm^{-2}$ *C. gloeosporioides* | 0,00 | 1,00 |
| (lavado x não lavado) 25 J $cm^{-2}$ *C. gloeosporioides* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 20 J $cm^{-2}$) lavado *C. gloeosporioides* | 0,00 | 0,99 |
| (15 x 25 J $cm^{-2}$) lavado *C. gloeosporioides* | 0,00 | 0,99 |
| (20 x 25 J $cm^{-2}$) lavado *C. gloeosporioides* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 20 J $cm^{-2}$) não lavado *C. gloeosporioides* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 25 J $cm^{-2}$) não lavado *C. gloeosporioides* | 0,00 | 1,00 |
| (20 x 25 J $cm^{-2}$) não lavado *C. gloeosporioides* | 0,00 | 1,00 |
| (lavado x não lavado) 15 J $cm^{-2}$ *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |
| (lavado x não lavado) 20 J $cm^{-2}$ *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |
| (lavado x não lavado) 25 J $cm^{-2}$ *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |

**Continua**

| | | |
|---|---|---|
| **Conclusão** | | |
| (15 x 20 J $cm^{-2}$) lavado *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 25 J $cm^{-2}$) lavado *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |
| (20 x 25 J $cm^{-2}$) lavado *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 20 J $cm^{-2}$) não lavado *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |
| (15 x 25 J $cm^{-2}$) não lavado *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |
| (20 x 25 J $cm^{-2}$) não lavado *A. nidulans* | 0,00 | 1,00 |

**APÊNDICE C –** Comparações entre as médias das frações de sobrevivência dos conídios de *Colletotrichum acutatum* com os FS 8-MOP, F1 e F2. Os conídios foram incubados com o FS e, a seguir, lavados ou não para retirada do excesso de FS, antes de serem expostas às diferentes doses de luz (Sol) os experimentos foram realizados nos dias 03 e 17 de abril de 2012

| **Comparações** | **Diferença entre as médias** | ***P* – Valor** |
|---|---|---|
| (lavado x não lavado) 1 h 8-MOP (50 µM) 03/04/2012 | 0,03 | 0,0001 |
| (lavado x não lavado) 2 h 8-MOP (50 µM) 03/04/2012 | 0,00 | 0,29 |
| (lavado x não lavado) 1 h F1 (12,5 mg $L^{-1}$) 03/04/2012 | 0,53 | 0,0001 |
| (lavado x não lavado) 2 h F1 (12,5 mg $L^{-1}$) 03/04/2012 | 0,03 | 0,01 |
| (lavado x não lavado) 1 h F2 (50 µM) 03/04/2012 | 0,10 | 0,0001 |
| (lavado x não lavado) 2 h F2 (50 µM) 03/04/2012 | 0,02 | 0,03 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado 8-MOP 1h 03/04/2012 | 0,00 | 0,34 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado 8-MOP 2h 03/04/2012 | 0,00 | 0,99 |
| (6,25 mg $L^{-1}$ x 12,5 mg $L^{-1}$) não lavado F1 1h 03/04/2012 | 0,06 | 0,0001 |
| (6,25 mg $L^{-1}$ x 12,5 mg $L^{-1}$) não lavado F1 2h 03/04/2012 | 0,00 | 0,69 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado F2 1h 03/04/2012 | 0,12 | 0,0001 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado F2 2h 03/04/2012 | 0,21 | 0,0001 |
| (lavado x não lavado) 1 h 8-MOP (50 µM) 17/04/2012 | 0,05 | 0,0001 |
| (lavado x não lavado) 2 h 8-MOP (50 µM) 17/04/2012 | 0,00 | 0,0002 |
| (lavado x não lavado) 1 h F1 (12,5 mg $L^{-1}$) 17/04/2012 | 0,49 | 0,0001 |

**Continua**

**Conclusão**

| | | |
|---|---|---|
| (lavado x não lavado) 2 h F1 (12,5 mg $L^{-1}$) 17/04/2012 | 0,04 | 0,01 |
| (lavado x não lavado) 1 h F2 (50 µM) 17/04/2012 | 0,22 | 0,0001 |
| (lavado x não lavado) 2 h F2 (50 µM) 17/04/2012 | 0,03 | 0,04 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado 8-MOP 1h 17/04/2012 | 0,00 | 0,46 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado 8-MOP 2h 17/04/2012 | 0,00 | 0,99 |
| (6,25 mg $L^{-1}$ x 12,5 mg $L^{-1}$) não lavado F1 1h 17/04/2012 | 0,11 | 0,0001 |
| (6,25 mg $L^{-1}$ x 12,5 mg $L^{-1}$) não lavado F1 2h 17/04/2012 | 0,00 | 0,91 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado F2 1h 03/04/2012 | 0,17 | 0,0001 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado F2 2h 03/04/2012 | 0,19 | 0,0001 |

**APÊNDICE D –** Comparações entre as médias das frações de sobrevivência dos conídios de *Aspergillus nidulans* com os FS 8-MOP, F1 e F2. Os conídios foram incubados com o FS e, a seguir, lavados ou não para retirada do excesso de FS, antes de serem expostas às diferentes doses de luz (Sol) os experimentos foram realizados nos dias 03 e 17 de abril de 2012

| **Comparações** | **Diferença entre as médias** | ***P* – Valor** |
|---|---|---|
| (lavado x não lavado) 1 h 8-MOP (50 µM) 03/04/2012 | 0,00 | 0,93 |
| (lavado x não lavado) 2 h 8-MOP (50 µM) 03/04/2012 | 0,00 | 0,99 |
| (lavado x não lavado) 1 h F1 (12,5 mg $L^{-1}$) 03/04/2012 | 0,00 | 0,94 |
| (lavado x não lavado) 2 h F1 (12,5 mg $L^{-1}$) 03/04/2012 | 0,00 | 0,99 |
| (lavado x não lavado) 1 h F2 (50 µM) 03/04/2012 | 0,00 | 0,97 |
| (lavado x não lavado) 2 h F2 (50 µM) 03/04/2012 | 0,00 | 0,99 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado 8-MOP 1h 03/04/2012 | 0,00 | 0,99 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado 8-MOP 2h 03/04/2012 | 0,00 | 0,99 |
| (6,25 mg $L^{-1}$ x 12,5 mg $L^{-1}$) não lavado F1 1h 03/04/2012 | 0,00 | 0,99 |
| (6,25 mg $L^{-1}$ x 12,5 mg $L^{-1}$) não lavado F1 2h 03/04/2012 | 0,00 | 0,99 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado F2 1h 03/04/2012 | 0,00 | 0,96 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado F2 2h 03/04/2012 | 0,00 | 0,92 |
| (lavado x não lavado) 1 h 8-MOP (50 µM) 17/04/2012 | 0,00 | 0,32 |
| (lavado x não lavado) 2 h 8-MOP (50 µM) 17/04/2012 | 0,00 | 0,91 |
| (lavado x não lavado) 1 h F1 (12,5 mg $L^{-1}$) 17/04/2012 | 0,00 | 0,92 |
| (lavado x não lavado) 2 h F1 (12,5 mg $L^{-1}$) 17/04/2012 | 0,00 | 0,99 |

**Continua**

**Conclusão**

| | | |
|---|---|---|
| (lavado x não lavado) 1 h F2 (50 µM) 17/04/2012 | 0,00 | 0,54 |
| (lavado x não lavado) 2 h F2 (50 µM) 17/04/2012 | 0,00 | 0,88 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado 8-MOP 1h 17/04/2012 | 0,00 | 0,95 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado 8-MOP 2h 17/04/2012 | 0,00 | 0,97 |
| (6,25 mg $L^{-1}$ x 12,5 mg $L^{-1}$) não lavado F1 1h 17/04/2012 | 0,00 | 0,99 |
| (6,25 mg $L^{-1}$ x 12,5 mg $L^{-1}$) não lavado F1 2h 17/04/2012 | 0,00 | 0,99 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado F2 1h 03/04/2012 | 0,00 | 0,49 |
| (25 µM x 50 µM) não lavado F2 2h 03/04/2012 | 0,00 | 0,23 |

**APÊNDICE E –** Comparações entre as médias da sobrevivência relativa de 5 linhagens de *Colletotrichum acutatum* após exposição às doses de 6,5, 13, 19,4, 25,9, 38,9 kJ $m^{-2}$ de UVB

| **Comparações** | **Diferença entre as médias** | ***P* – Valor** |
|---|---|---|
| (CA 1209 x CA MG-1) tempo de exposição 1 h | -9,09 | 0,01 |
| (CA 1209 x CA MG-1) tempo de exposição 2 h | -1,01 | 0,67 |
| (CA 1209 x CA MG-1) tempo de exposição 3 h | -3,30 | 0,17 |
| (CA 1209 x CA MG-1) tempo de exposição 4 h | -0,99 | 0,71 |
| (CA 1209 x CA MG-1) tempo de exposição 6 h | 0,00 | 1,00 |
| (CA 1209 x CA T-2) tempo de exposição 1 h | -12,41 | 0,0001 |
| (CA 1209 x CA T-2) tempo de exposição 2 h | -17,62 | 0,0001 |
| (CA 1209 x CA T-2) tempo de exposição 3 h | -10,92 | 0,0001 |
| (CA 1209 x CA T-2) tempo de exposição 4 h | -4,64 | 0,05 |
| (CA 1209 x CA T-2) tempo de exposição 6 h | 0,00 | 1,00 |
| (CA 1209 x CA B-3) tempo de exposição 1 h | 9,48 | 0,01 |
| (CA 1209 x CA B-3) tempo de exposição 2 h | 11,12 | 0,0001 |
| (CA 1209 x CA B-3) tempo de exposição 3 h | -5,52 | 0,02 |
| (CA 1209 x CA B-3) tempo de exposição 4 h | 0,01 | 1,00 |
| (CA 1209 x CA B-3) tempo de exposição 6 h | 0,00 | 1,00 |
| (CA 1209 x CA P-4) tempo de exposição 1 h | -11,89 | 0,0001 |
| (CA 1209 x CA P-4) tempo de exposição 2 h | -20,40 | 0,0001 |
| (CA 1209 x CA P-4) tempo de exposição 3 h | -1,74 | 0,46 |
| (CA 1209 x CA P-4) tempo de exposição 4 h | -0,41 | 0,86 |
| (CA 1209 x CA P-4) tempo de exposição 6 h | 0,00 | 1,00 |
| (CA B-3 x CA MG-1) tempo de exposição 1 h | -18,57 | 0,0001 |
| (CA B-3 x CA MG-1) tempo de exposição 2 h | -12,12 | 0,0001 |
| (CA B-3 x CA MG-1) tempo de exposição 3 h | 2,22 | 0,35 |
| (CA B-3 x CA MG-1) tempo de exposição 4 h | -1,00 | 0,71 |

**Continua**

| | | |
|---|---|---|
| (CA B-3 x CA MG-1) tempo de exposição 6 h | 0,00 | 1,00 |
| (CA B-3 x CA P-4) tempo de exposição 1 h | -21,37 | 0,0001 |
| (CA B-3 x CA P-4) tempo de exposição 2 h | -31,52 | 0,0001 |
| (CA B-3 x CA P-4) tempo de exposição 3 h | 3,78 | 0,12 |
| (CA B-3 x CA P-4) tempo de exposição 4 h | -0,42 | 0,86 |
| (CA B-3 x CA P-4) tempo de exposição 6 h | 0,00 | 1,00 |
| (CA 1209 x CA P-4) tempo de exposição 1 h | -21,89 | 0,0001 |
| (CA 1209 x CA P-4) tempo de exposição 2 h | -28,74 | 0,0001 |
| (CA 1209 x CA P-4) tempo de exposição 3 h | -5,40 | 0,03 |
| (CA 1209 x CA P-4) tempo de exposição 4 h | -4,65 | 0,05 |
| (CA 1209 x CA P-4) tempo de exposição 6 h | 0,00 | 1,00 |
| (CA MG-1 x CA P-4) tempo de exposição 1 h | -2,80 | 0,24 |
| (CA MG-1 x CA P-4) tempo de exposição 2 h | -19,40 | 0,0001 |
| (CA MG-1 x CA P-4) tempo de exposição 3 h | 1,56 | 0,51 |
| (CA MG-1 x CA P-4) tempo de exposição 4 h | 0,58 | 0,83 |
| (CA MG-1 x CA P-4) tempo de exposição 6 h | 0,00 | 1,00 |
| (CA MG-1 x CA T-2) tempo de exposição 1 h | -3,32 | 0,17 |
| (CA MG-1 x CA T-2) tempo de exposição 2 h | -16,61 | 0,0001 |
| (CA MG-1 x CA T-2) tempo de exposição 3 h | -7,62 | 0,01 |
| (CA MG-1 x CA T-2) tempo de exposição 4 h | -3,65 | 0,17 |
| (CA MG-1 x CA T-2) tempo de exposição 6 h | 0,00 | 1,00 |
| (CA P-4 x CA T-2) tempo de exposição 1 h | -0,52 | 0,83 |
| (CA P-4 x CA T-2) tempo de exposição 2 h | 2,78 | 0,24 |
| (CA P-4 x CA T-2) tempo de exposição 3 h | -9,18 | 0,0001 |
| (CA P-4 x CA T-2) tempo de exposição 4 h | -4,23 | 0,08 |
| (CA P-4 x CA T-2) tempo de exposição 6 h | 0,00 | 1,00 |
| (tempo de exposição 1 h x 2 h) CA 1209 | 50,02 | 0,0001 |

**Continua**

| | | |
|---|---|---|
| (tempo de exposição 1 h x 3 h) CA 1209 | 77,91 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 1 h x 4 h) CA 1209 | 82,34 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 1 h x 6 h) CA 1209 | 84,77 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 3 h) CA 1209 | 27,89 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 4 h) CA 1209 | 32,32 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 6 h) CA 1209 | 34,75 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 3 h x 4 h) CA 1209 | 4,43 | 0,07 |
| (tempo de exposição 3 h x 6 h) CA 1209 | 6,86 | 0,01 |
| (tempo de exposição 4 h x 6 h) CA 1209 | 2,43 | 0,31 |
| (tempo de exposição 1 h x 2 h) CA B-3 | 51,66 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 1 h x 3 h) CA B-3 | 62,92 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 1 h x 4 h) CA B-3 | 72,87 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 1 h x 6 h) CA B-3 | 75,29 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 3 h) CA B-3 | 11,26 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 4 h) CA B-3 | 21,21 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 6 h) CA B-3 | 23,63 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 3 h x 4 h) CA B-3 | 9,95 | 0,01 |
| (tempo de exposição 3 h x 6 h) CA B-3 | 12,37 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 4 h x 6 h) CA B-3 | 2,42 | 0,31 |
| (tempo de exposição 1 h x 2 h) CA MG-1 | 58,11 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 1 h x 3 h) CA MG-1 | 83,71 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 1 h x 4 h) CA MG-1 | 90,44 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 1 h x 6 h) CA MG-1 | 93,86 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 3 h) CA MG-1 | 25,60 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 4 h) CA MG-1 | 32,34 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 6 h) CA MG-1 | 35,76 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 3 h x 4 h) CA MG-1 | 6,73 | 0,01 |

**Continua**

**Conclusão**

| | | |
|---|---|---|
| (tempo de exposição 3 h x 6 h) CA MG-1 | 10,15 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 4 h x 6 h) CA MG-1 | 3,42 | 0,20 |
| (tempo de exposição 1 h x 2 h) CA P-4 | 41,51 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 1 h x 3 h) CA P-4 | 88,06 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 1 h x 4 h) CA P-4 | 93,82 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 1 h x 6 h) CA P-4 | 96,66 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 3 h) CA P-4 | 46,56 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 4 h) CA P-4 | 52,31 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 6 h) CA P-4 | 55,15 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 3 h x 4 h) CA P-4 | 5,76 | 0,02 |
| (tempo de exposição 3 h x 6 h) CA P-4 | 8,60 | 0,01 |
| (tempo de exposição 4 h x 6 h) CA P-4 | 2,84 | 0,23 |
| (tempo de exposição 1 h x 2 h) CA T-2 | 44,81 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 1 h x 3 h) CA T-2 | 79,40 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 1 h x 4 h) CA T-2 | 90,11 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 1 h x 6 h) CA T-2 | 97,18 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 3 h) CA T-2 | 34,59 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 4 h) CA T-2 | 45,30 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 2 h x 6 h) CA T-2 | 52,37 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 3 h x 4 h) CA T-2 | 10,70 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 3 h x 6 h) CA T-2 | 17,78 | 0,0001 |
| (tempo de exposição 4 h x 6 h) CA T-2 | 7,07 | 0,01 |

**APÊNDICE F –** Comparação entre as médias do numero de conídios produzidos por colônias que cresceram expostas à luz visível (12 h claro/12 h escuro) ou em completa escuridão

| **Comparações** | **Diferença entre as médias** | ***P* – Valor** |
|---|---|---|
| CA T-2 claro x escuro | 1,338 | 0,001 |

**APÊNDICE G –** Comparações entre as médias da sobrevivência relativa de conídios das linhagens CA T-2 e CA B-3 de *C. acutatum* produzido por colônias que cresceram no escuro e com fotoperíodos de 12 h (claro/escuro), após duas e três horas de exposição à radiação UVB

| **Comparações** | **Diferença entre as médias** | ***P* – Valor** |
|---|---|---|
| (CA B-3 claro x escuro) tempo de exposição 2 h | 53,51 | 0,0001 |
| (CA B-3 claro x escuro) tempo de exposição 3 h | 35,94 | 0,0001 |
| (CA T-2 claro x escuro) tempo de exposição 2 h | 46,90 | 0,0001 |
| (CA T-2 claro x escuro) tempo de exposição 3 h | 43,87 | 0,0001 |
| (CA B-3 tempo de exposição 2 h x 3h) claro | 35,69 | 0,0001 |
| (CA B-3 tempo de exposição 2 h x 3h) escuro | 18,12 | 0,01 |
| (CA T-2 tempo de exposição 2 h x 3h) claro | 28,35 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 2 h x 3h) escuro | 25,33 | 0,0001 |

**APÊNDICE H –** Comparações entre as médias da sobrevivência relativa de conídios das linhagens CA T-2 de *C. acutatum*, ARSEF 324 de *M. acridum* e ATCC 10074 de *A. nidulans*, produzidos por colônias que cresceram no escuro e por colônias que cresceram com fotoperíodos de 12 h (claro/escuro), após uma, duas e três horas de exposição à radiação UV-B

| **Comparações** | **Diferença entre as médias** | ***P* – Valor** |
|---|---|---|
| (*A. nidulans* claro x escuro) tempo de exposição 1h | -6,781 | 0,014 |
| (*A. nidulans* claro x escuro) tempo de exposição 2h | -4,553 | 0,093 |
| (*A. nidulans* claro x escuro) tempo de exposição 3h | -1,927 | 0,470 |
| (CA T-2 claro x escuro) tempo de exposição 1h | 12,907 | 0,0001 |
| (CA T-2 claro x escuro) tempo de exposição 2h | 29,737 | 0,0001 |
| (CA T-2 claro x escuro) tempo de exposição 3h | 51,578 | 0,0001 |
| (*M. acridum* claro x escuro) tempo de exposição 1h | 22,881 | 0,0001 |
| (*M. acridum* claro x escuro) tempo de exposição 2h | 34,330 | 0,0001 |
| (*M. acridum* claro x escuro) tempo de exposição 3h | 21,061 | 0,0001 |
| (*A. nidulans* tempo de exposição 1h x 2h) claro | 33,022 | 0,0001 |
| (*A. nidulans* tempo de exposição 1h x 3h) claro | 45,066 | 0,0001 |
| (*A. nidulans* tempo de exposição 2h x 3h) claro | 12,044 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 1h x 2h) claro | 11,146 | 0,000 |
| (CA T-2 tempo de exposição 1h x 3h) claro | 27,423 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 2h x 3h) claro | 16,277 | 0,0001 |
| (*M acridum* tempo de exposição 1h x 2h) claro | 10,015 | 0,001 |
| (*M acridum* tempo de exposição 1h x 3h) claro | 32,800 | 0,0001 |
| (*M acridum* tempo de exposição 2h x 3h) claro | 22,785 | 0,0001 |
| (*A. nidulans* tempo de exposição 1h x 2h) escuro | 35,250 | 0,0001 |
| (*A. nidulans* tempo de exposição 1h x 3h) escuro | 49,920 | 0,0001 |

**Continua**

| | | |
|---|---|---|
| (*A. nidulans* tempo de exposição 2h x 3h) escuro | 14,670 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 1h x 2h) escuro | 27,976 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 1h x 3h) escuro | 66,093 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 2h x 3h) escuro | 38,117 | 0,0001 |
| (*M acridum* tempo de exposição 1h x 2h) escuro | 21,464 | 0,0001 |
| (*M acridum* tempo de exposição 1h x 3h) escuro | 30,980 | 0,0001 |
| (*M acridum* tempo de exposição 2h x 3h) escuro | 9,516 | 0,001 |
| (*A nidulans* tempo de exposição 1h x CA T-2 tempo de exposição 1h) claro | -47,402 | 0,0001 |
| (*A nidulans* tempo de exposição 2h x CA T-2 tempo de exposição 2h) claro | -69,278 | 0,0001 |
| (*A nidulans* tempo de exposição 3h x CA T-2 tempo de exposição 3h) claro | -65,045 | 0,0001 |
| (*A nidulans* tempo de exposição 1h x CA T-2 tempo de exposição 1h) escuro | -27,714 | 0,0001 |
| (*A nidulans* tempo de exposição 2h x CA T-2 tempo de exposição 2h) escuro | -34,988 | 0,0001 |
| (*A nidulans* tempo de exposição 3h x CA T-2 tempo de exposição 3h) escuro | -11,541 | 0,0001 |
| (*A nidulans* tempo de exposição 1h x *M. acridum* tempo de exposição 1h) claro | -39,552 | 0,0001 |
| (*A nidulans* tempo de exposição 2h x *M. acridum* tempo de exposição 2h) claro | -62,559 | 0,0001 |
| (*A nidulans* tempo de exposição 3h x *M. acridum* tempo de exposição 3h) claro | -51,817 | 0,0001 |
| (*A nidulans* tempo de exposição 1h x *M. acridum* tempo de exposição 1h) escuro | -9,890 | 0,001 |
| (*A nidulans* tempo de exposição 2h x *M. acridum* tempo de exposição 2h) escuro | -23,676 | 0,0001 |
| (*A nidulans* tempo de exposição 3h x *M. acridum* tempo de exposição 3h) escuro | -28,830 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 1h x *M. acridum* tempo de exposição 1h) claro | 7,850 | 0,005 |

**Continua**

**Conclusão**

| | | |
|---|---|---|
| (CA T-2 tempo de exposição 2h x *M. acridum* tempo de exposição 2h) claro | 6,719 | 0,015 |
| (CA T-2 tempo de exposição 3h x *M. acridum* tempo de exposição 3h) claro | 13,228 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 1h x *M. acridum* tempo de exposição 1h) escuro | 17,824 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 2h x *M. acridum* tempo de exposição 2h) escuro | 11,312 | 0,000 |
| (CA T-2 tempo de exposição 3h x *M. acridum* tempo de exposição 3h) escuro | -17,289 | 0,0001 |

**APÊNDICE I –** Comparações entre as médias da sobrevivência relativa de conídios da linhagem CA T-2 de *C. acutatum* produzidos por colônias que cresceram no escuro e por colônias que cresceram com fotoperíodos de 12 h (claro/escuro), após três, cinco, sete e nove horas de exposição à radiação UVB

| **Comparações** | **Diferença entre as médias** | ***P* – Valor** |
|---|---|---|
| (CA T-2 claro x escuro) tempo de exposição 3h | 33,50 | 0,0001 |
| (CA T-2 claro x escuro) tempo de exposição 5h | 31,61 | 0,0001 |
| (CA T-2 claro x escuro) tempo de exposição 7h | 16,78 | 0,0001 |
| (CA T-2 claro x escuro) tempo de exposição 9h | 16,27 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 3 h x 5h) claro | 14,46 | 0,01 |
| (CA T-2 tempo de exposição 3 h x 7h) claro | 34,65 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 3 h x 9h) claro | 44,66 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 5 h x 7h) claro | 20,19 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 5 h x 9h) claro | 30,20 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 7 h x 9h) claro | 10,00 | 0,01 |
| (CA T-2 tempo de exposição 3 h x 5h) escuro | 12,57 | 0,01 |
| (CA T-2 tempo de exposição 3 h x 7h) escuro | 17,93 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 3 h x 9h) escuro | 27,42 | 0,0001 |
| (CA T-2 tempo de exposição 5 h x 7h) escuro | 5,36 | 0,10 |
| (CA T-2 tempo de exposição 5 h x 9h) escuro | 14,85 | 0,01 |
| (CA T-2 tempo de exposição 7 h x 9h) escuro | 9,49 | 0,01 |