UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Isolamento, caracterização e avaliação da atividade fotossensibilizadora de
cumarinas e furanocumarinas extraídas de espécies de *Citrus***

Letícia Fracaroli

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Isolamento, caracterização e avaliação da atividade fotossensibilizadora de
cumarinas e furanocumarinas extraídas de espécies de *Citrus***

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Letícia Fracarolli

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 23/09/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2015

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.

Fracarolli, Letícia

Isolamento, caracterização e avaliação da atividade fotossensibilizadora de cumarinas e furanocumarinas extraídas de espécies de *Citrus*. Ribeirão Preto, 2015.

144 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Braga, Gilberto Úbida Leite.

1. Tratamento fotodinâmico antimicrobiano. 2. *Colletotrichum acutatum*. 3. limão Tahiti. 4. toranja. 5. *Citrus*. 6. cumarinas. 7. furanocumarinas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Letícia Fracarolli

Título do trabalho: Isolamento, caracterização e avaliação da atividade fotossensibilizadora de cumarinas e furanocumarinas extraídas de espécies de *Citrus*.

Dissertação de Mestrado apresentada o 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 Antonio Carlos e Gislene, minhas irmãs Juliana e Mariana, e ao meu namorado Gabriel, pelo apoio incondicional e confiança que sempre depositaram em mim. Sem o apoio de vocês essa vitória não seria alcançada;
- A toda minha família e amigos pelo entusiasmo com o meu trabalho e por se importarem comigo;
- A Deus por ter me dado sabedoria para seguir minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga, muito obrigada pela oportunidade de trabalhar e aprender com você. Obrigada por contribuir com meu crescimento pessoal e profissional. Com certeza tudo o que foi aprendido irá me acompanhar por toda a vida;
- Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP por me receber em seu laboratório, pelo apoio e ensinamentos. Muito obrigada por também contribuir com meu crescimento pessoal e profissional;
- A Doutora Ana Carolina Pereira do Programa de Ciências Farmacêuticas da FCFRP pelo auxílio com o isolamento e identificação das cumarinas e também pela amizade;
- A colega de trabalho Doutora Gabriela Braga Rodrigues do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP pelo auxílio nos experimentos realizados no laboratório de Fotobiologia e Genética de Microrganismos, pela amizade e apoio;
- A todos os alunos e técnicos do laboratório de Farmacognosia da FCFRP pelos conselhos, dicas, amizade e apoio de sempre;
- Ao Prof. Dr. Luciano Bachmann do Departamento de Física da FFCLRP pelo auxílio na dosimetria da radiação solar;
- Aos colegas de trabalho do laboratório de Fotobiologia e Genética de microrganismos Júlia Cunha Gonzales, Guilherme Thomaz Pereira Brancini, Mariana de Souza Lima Rambaldi, Henrique Dantas de Menezes e, ao técnico Fernando Grine Martins pela ajuda e apoio durante os experimentos, e pela amizade;
- Ao Prof. Dr. Amando Siuti Ito pelo empréstimo dos seus equipamentos para que eu pudesse analisar as características físico-químicas das substâncias utilizadas no trabalho;
- 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 a linhagem de *Colletotrichum* utilizada no trabalho;
- A Empresa Citrosuco por ceder os produtos provenientes de espécies de *Citrus* utilizados no trabalho;

- Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de mestrado;
- A toda minha família e amigos por acreditarem em mim sempre;
- E a Deus pela proteção que me foi dada e, apesar dos muitos percalços, ter me guiado para que conseguisse vencer esta etapa da minha vida.

“Eu aprendi que coragem não é a ausência de medo, mas o triunfo sobre ele. O homem corajoso não é aquele que não sente medo, mas aquele que conquista por cima do medo.”

Nelson Mandela

RESUMO

FRACAROLLI, L. **Isolamento, caracterização e avaliação da atividade fotossensibilizadora de cumarinas e furanocumarinas extraídas de espécies de *Citrus***. 2015. 144f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O crescente aumento da tolerância aos fungicidas atualmente utilizados é um dos principais problemas tanto na área clínica quanto na agrícola e tem estimulado o desenvolvimento de estratégias alternativas para o controle de fungos patogênicos, tais como o tratamento fotodinâmico antimicrobiano (TFA), que pode utilizar fotossensibilizadores (FS) de origem natural ou sintética. Alguns FS, como as cumarinas e furanocumarinas, são produzidos por espécies de *Citrus* como limão Tahiti (*Citrus latifolia*) e toranjas (*Citrus paradisi*). O presente estudo investigou o TFA *in vitro* de conídios do fungo fitopatogênico *Colletotrichum acutatum* com: (1) o corante fenotiazínico azul de metileno (MB), (2) uma furanocumarina comercial, 8-metoxipsoraleno (8-MOP), (3) uma cumarina comercial, (2H-chromen-2-one), (4) a cumarina 5,7-dimetoxicumarina extraída no presente trabalho a partir de óleo da casca do limão Tahiti, (5) a cumarina 7-hidroxycumarina extraída no presente trabalho a partir de óleo essencial de toranja rubi, (6) duas frações extraídas por De Menezes e colaboradores (2014a) a partir de um resíduo da indústria citrícola, uma delas constituída pela furanocumarina isopimpinellina e outra constituída por uma mistura das cumarinas 7-metoxicumarina e 5,7-dimetoxicumarina (3:1), (7) cinco extratos brutos obtidos a partir de óleos da casca e essencial de limão Tahiti e óleos essenciais de toranjas rubi e branca. Com exceção do extrato bruto obtido do óleo essencial de toranja branca, todos os demais extratos apresentaram cumarinas e/ou furanocumarinas em sua composição. As suspensões de conídios foram tratadas com os diferentes compostos (50 μM para os compostos comerciais e as frações puras e 12,5 mg L^{-1} para os extratos e a mistura) e expostas à radiação solar por 1 h. O MB foi exposto à radiação solar por 30 min, 1 e 2 h. Determinou-se o efeito do tratamento fotodinâmico em folhas de mudas de laranja Valencia (*Citrus sinensis*) com (1) 8-MOP, (2) mistura de cumarinas, (3) 5,7-dimetoxicumarina e (4) o extrato bruto de limão Tahiti. Adicionalmente, experimentos para avaliar a estabilidade do 8-MOP exposto à radiação solar por até 12 h foram realizados. Nesses experimentos, soluções de 8-MOP (50 μM) foram expostas à radiação solar e alíquotas foram retiradas após os diferentes tempos de exposição. Após as exposições, estudos de espectroscopia de absorção no UV e emissão de fluorescência foram realizados, além da realização de experimentos para avaliar a eficácia do TFA com os FS previamente expostos à radiação solar por 6 e 12 h. Os TFA mais eficazes foram com o MB, 8-MOP (ambos 50 μM), a mistura de cumarinas e um dos extratos brutos obtidos de limão Tahiti (ambos 12,5 mg L^{-1}), que mataram 99,998%, 99,378%, 99,336% e 65,049% dos conídios, respectivamente, após 1 h de exposição à radiação solar. Nenhum dano nas folhas de laranja foi observado após o TFA com os compostos. Os espectros de absorção e emissão de fluorescência das soluções de 8-MOP expostas à radiação solar mostraram fotodegradação do composto após 12 h de exposição. Entretanto, as soluções de 8-MOP expostas por 6 e por 12 h ainda foram capazes de matar 99,978% e 95,591% dos conídios de *C. acutatum*, respectivamente.

Palavras-chave: Tratamento fotodinâmico antimicrobiano, *Colletotrichum acutatum*, limão Tahiti, toranja, *Citrus*, cumarinas, furanocumarinas.

ABSTRACT

FRACAROLLI, L. **Isolation, characterization and evaluation of photosensitizer activity of coumarins and furocoumarins extracted from *Citrus* species.** 2015. 144f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Increasing tolerance to currently used fungicides is a major problem both in clinical and agricultural areas and has stimulated the development of alternative strategies to control pathogenic fungi such as the antimicrobial photodynamic treatment (APDT), that can use natural or synthetic photosensitizers (PS). Some PS, such as coumarins and furocoumarins are produced by *Citrus* species such Tahiti acid lime (*Citrus latifolia*) and grapefruit (*Citrus paradisi*). This study investigated the *in vitro* APDT of conidia of the plant-pathogenic fungi *C. acutatum* with: (1) the phenothiazinium dye methylene blue (MB), (2) commercial furocoumarin, 8-methoxypsoralen (8-MOP), (3) commercial coumarin (2H-chromen-2-one), (4) coumarin 5,7-dimethoxycoumarin, extracted in this study from Tahiti lime peel oil, (5) coumarin 7-hidroxicoumarina, extracted in this study from ruby grapefruit essential oil, (6) two fractions extracted by De Menezes et al (2014a) from a *Citrus* industry residue, one of them constituted by the furocoumarin isopimpinellin, and the other constituted by the mixture of coumarins 7-methoxycoumarin and 5,7-dimethoxycoumarin (3:1), (7) five crude extracts obtained from Tahiti lime peel or essential oil and ruby and white grapefruit essential oil. Except the extract from the white grapefruit, all the others presented coumarins and/or furocoumarins in their composition. Conidial suspensions were treated with the different PS (50 μM for commercial and pure compounds and 12.5 mg L^{-1} for the extracts and the mixture) and exposed to solar radiation for 1 h. The MB was exposed to solar radiation for 30 min, 1 and 2 h. The APDT effect on the leaves of Valencia orange trees (*Citrus sinensis*) with (1) 8-MOP, (2) the mixture of coumarins, (3) 5,7-dimethoxycoumarin, and (4) the most effective extract from Tahiti lime were determined. Additionally, experiments to assess the 8-MOP stability after exposure to solar radiation for 12 h were realized. 8-MOP solutions (50 μM) were exposed under solar radiation and rates were removed after different times of exposition. After the expositions, absorption spectroscopic studies in UV and fluorescence emission were realized, as well as holding the realization of experiments of APDT efficacy evaluation after 6 and 12 h to exposure under solar radiation. The more effective treatments were with MB, 8-MOP (both 50 μM), the coumarins mixture and one of the extracts from Tahiti lime (both 12.5 mg L^{-1}), killing at least 99,998%, 99,378%, 99,336% and 65,049% of the conidia, respectively after 1 h under solar radiation. No damage to orange tree leaves was observed after APDT with any of the compounds. The absorption and fluorescence intensity spectra showed the 8-MOP photodegradation after 12 h of exposition, although the 8-MOP solutions exposed under solar radiation for 6 and 12 h still killed at least 99,978% and 95,591% of the *C. acutatum* conidia, respectively

Keywords: Antimicrobial photodynamic treatment, *Colletotrichum acutatum*, Tahiti lime, grapefruit, *Citrus*, coumarins, furocoumarins.

RESUMEN

FRACAROLLI, L. **Aislamiento, caracterización y evaluación de la actividad fotosensibilizante de cumarinas y furanocumarinas extraídas de especies de Citrus.** 2015. 144f. Disertación (Maestría). Facultad de Ciencias Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

El creciente aumento de la tolerancia a los fungicidas actualmente utilizados es uno de los principales problemas tanto en el área clínica como agrícola, y ha estimulado el desarrollo de estrategias alternativas para el control de hongos patógenos tales como el tratamiento fotodinámico antimicrobiano (TFA), que puede utilizar fotosensibilizadores (FS) de origen natural o sintético. Algunos FS, como las cumarinas y furanocumarinas son producidos por especies de *Citrus* como limón Tahiti (*Citrus latifolia*) y pomelo (*Citrus paradisi*). El presente estudio investigó TFA *in vitro* de conidios del hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum* con: (1) el colorante fenotiazina azul de metileno (MB), (2) una furanocumarina comercial, 8-metoxipsoraleno (8-MOP), (3) una cumarina comercial (2H-chromen-2-one), (4) la cumarina 5,7-dimetoxicumarina extraída en este trabajo a partir de aceite de la corteza del limón Tahiti, (5) la cumarina 7-hidroxycumarina extraída en este trabajo a partir de aceite esencial de pomelo rubi, (6) dos fracciones extraídas por De Menezes y colaboradores (2014a) a partir de un residuo de la industria de cítricos, una de ellas constituida por furanocumarina isopimpinellina y otra que consiste en una mezcla de cumarinas 7-metoxicumarina y 5,7-dimetoxicumarina (3:1), (7) cinco extractos crudos obtenidos a partir de aceites de la corteza y esencial de limón Tahiti y aceites esenciales de pomelos rubi y blanca. Aparte del extracto bruto obtenido a partir del aceite esencial de pomelo blanca, todos los demás extractos presentaron cumarinas y furanocumarinas en su composición. Las suspensiones de conidios fueron tratadas con los diferentes compuestos (50 μM para los compuestos comerciales y las fracciones puras y 12,5 mg L^{-1} para los extractos y la mezcla) y expuestas a la radiación solar durante 1 h. El MB fue expuesto a la radiación solar durante 30 minutos, 1 y 2 horas. El efecto del tratamiento en las hojas de plantas de naranja Valencia (*Citrus sinensis*) con (1) 8-MOP, (2) mezcla de cumarinas, (3) 5,7-dimetoxicumarina y (4) el extracto crudo de limón Tahiti fue determinado. Además, los experimentos para evaluar la estabilidad del 8-MOP expuesto a la radiación solar durante un máximo de 12 horas fueron realizados. En estos experimentos, las soluciones de 8-MOP (50 μM) fueron expuestas a la radiación solar y las alícuotas fueron retiradas después de diferentes tiempos de la exposición. Tras las exposiciones, se realizaron estudios de espectroscopia de absorción en UV y emisión de fluorescencia, además de la realización de experimentos para evaluar la eficacia do TFA con los FS previamente expuestos a la radiación solar por 8 y 12 h. Los TFA más eficaces fueron con el MB, 8-MOP (ambos 50 μM), la mezcla de cumarinas y uno de los extractos crudos obtenidos del limón Tahiti (ambos 12,5 mg L^{-1}), que mataron un 99,998%, 99,937%, 99,336% y 65,049% de conidios, respectivamente, tras 1 hora de exposición a la radiación solar. Ninguno daño en las hojas de naranja se observó tras el TFA con los compuestos. Los espectros de absorción y emisión de fluorescencia de las soluciones de 8-MOP expuestas a la radiación solar mostraron fotodegradación del compuesto tras 12 horas de exposición. Sin embargo, las soluciones de 8-MOP expuestas durante 6 y 12 h también fueron capaces de matar un 99,978% y 95,591% de conidios de *C. acutatum*, respectivamente.

Palabras-clave: tratamiento fotodinámico antimicrobiano, *Colletotrichum acutatum*, limón Tahiti, pomelo, *Citrus*, cumarinas, furanocumarinas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Cromatograma obtido em CLAE da fração 6 do óleo da casca do limão Tahiti em MeOH/H ₂ O (gradiente), com detecção em 360 nm.....	14
Figura 2.	Cromatograma obtido em CLAE da fração 7 do óleo essencial da toranja rubi em MeOH/H ₂ O (gradiente), com detecção em 360 nm.....	15
Figura 3.	Cromatograma obtido em CLAE da fração Cl.6.p1 do óleo da casca do limão Tahiti em MeOH/H ₂ O (gradiente), com detecção em 360 nm.....	16
Figura 4.	Cromatograma obtido em CLAE da fração Cl.6.p2 do óleo essencial do limão Tahiti em MeOH/H ₂ O (gradiente), com detecção em 360 nm.....	17
Figura 5.	Cromatograma obtido em CLAE da fração Cpr.7.p1 do óleo essencial da toranja rubi em MeOH/H ₂ O (gradiente), com detecção em 360 nm.....	17
Figura 6.	Cromatograma obtido em CLAE da fração Cpr.7.p2 do óleo essencial da toranja rubi em MeOH/H ₂ O (gradiente), com detecção em 360 nm.....	18
Figura 7.	Estrutura química dos FS utilizados no estudo (A) 5,7-dimetoxicumarina, (B) 7-hidroxycumarina, (C) 8-metoxipsoraleno, (D) cumarina, (E) isopimpinellina, (F) mistura de 7-metoxicumarina e 5,7-dimetoxicumarina (3:1) e (G) azul de metileno.....	23
Figura 8.	Espectro de absorção no visível do azul de metileno. O espectro foi obtido na concentração de 50 µM.....	23
Figura 9.	Espectro de absorção no ultravioleta do 8-MOP e cumarina. Os espectros foram obtidos na concentração de 50 µM.....	24
Figura 10.	Espectro de absorção no ultravioleta dos extratos brutos obtidos dos óleos essenciais e da casca de limão Tahiti e toranjas rubi e branca. Os espectros foram obtidos na concentração de 12,5 mg L ⁻¹	24
Figura 11.	Espectro de absorção no ultravioleta das frações isoladas do óleo da casca de limão Tahiti óleo essencial de toranja rubi. Os espectros foram obtidos na concentração de 50 µM.....	25
Figura 12.	Cromatograma obtido em CG-EM da substância 1 da fração Cl.6.p1.....	31
Figura 13.	Espectro de massas (EM) obtido por CG-EM para a substância da fração Cl.6.p1 com t _R = 22,896 min e comparado com o EM contido na biblioteca de padrões.....	32
Figura 14.	Sugestão para a estrutura química da substância 1 presente na fração Cl.6.p1.....	32

Figura 15.	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância 1 em CDCl_3	34
Figura 16.	Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) na região do deslocamento de 3.56-4.32 da substância 1 em CDCl_3	35
Figura 17.	Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) na região do deslocamento 5.78-6.68 da substância 1 em CDCl_3	36
Figura 18.	Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) na região do deslocamento 7.48-8.34 da substância 1 em CDCl_3	37
Figura 19.	Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz) da substância 1 em CDCl_3	38
Figura 20.	Espectro de DEPT (500 MHz) da substância 1 em CDCl_3	39
Figura 21.	Espectro de HMQC (400 MHz) da substância 1 em CDCl_3	40
Figura 22.	Cromatograma obtido em CG-EM da fração Cpr.7.p1.....	41
Figura 23.	Espectro de massas (EM) obtido por CG-EM para a substância da fração Cpr.7.p1 com $t_R = 21,571$ min e comparado com o EM contido na biblioteca de padrões.....	42
Figura 24.	Sugestão para a estrutura química da substância 2 presente na fração Cpr.7.p1.....	42
Figura 25.	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância 2 em CD_3OD	44
Figura 26.	Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) na região do deslocamento 4.44-5.28 da substância 2 em CD_3OD	45
Figura 27.	Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) na região do deslocamento 5.70-6.52 da substância 2 em CD_3OD	46
Figura 28.	Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) na região do deslocamento 6.28-7.10 da substância 2 em CD_3OD	47
Figura 29.	Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) na região do deslocamento 7.36-8.18 da substância 2 em CD_3OD	48
Figura 30.	Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz) da substância 2 em CD_3OD	49
Figura 31.	Espectro de DEPT da substância 2 em CD_3OD	50
Figura 32.	Espectro de HMQC (400 MHz) da substância 2 em CD_3OD	51
Figura 33.	Cromatograma obtido em CG-EM do extrato bruto 1, que foi obtido do óleo da casca do limão Tahiti	52

Figura 34.	Cromatograma obtido em CG-EM do extrato bruto 2, que foi obtido do óleo essencial do limão Tahiti.....	53
Figura 35.	Cromatograma obtido em CG-EM do extrato bruto 3, que foi obtido do óleo das cascas de limão Tahiti maceradas em hexano.....	54
Figura 36.	Cromatograma obtido em CG-EM do extrato bruto 4, que foi obtido do óleo essencial de toranja rubi.....	55
Figura 37.	Cromatograma obtido em CG-EM do extrato bruto 5, que foi obtido do óleo essencial de toranja branca.....	57
Figura 38.	Irradiância espectral solar no UV (280 a 400 nm) (A) e no visível (400 a 700 nm) (B) do dia 19 de agosto de 2014 as 12 h.....	61
Figura 39.	Efeito do tratamento fotodinâmico com azul de metileno e radiação solar na sobrevivência dos conídios de <i>C. acutatum</i> . Os conídios foram incubados com o FS por 30 min e, a seguir, expostos à radiação solar por 30 min, 1 e 2 h. As barras de erros indicam o desvio padrão. Os experimentos foram realizados nos dias 16 e 17 de junho e 14 de julho de 2014. *Não foram observados sobreviventes.....	63
Figura 40.	Irradiância espectral solar no UV (280 a 400 nm) obtida às 12 h nos dias 02 e 17 de setembro e no dia 22 de outubro de 2014.....	64
Figura 41.	Sobrevivência relativa dos conídios de <i>C. acutatum</i> após o tratamento com os diferentes compostos e radiação solar. Os conídios foram incubados com os compostos por 30 min e, a seguir, expostos à radiação solar por 1 h. As barras de erros indicam o desvio padrão. Os experimentos foram realizados nos dias 14, 15 e 29 de outubro de 2014. *Não foram observados sobreviventes.....	67
Figura 42.	Sobrevivência relativa dos conídios de <i>C. acutatum</i> após o tratamento com os diferentes compostos e radiação solar. Os conídios foram incubados com os compostos por 30 min e, a seguir, expostos à radiação solar por 1 h. As barras de erros indicam o desvio padrão. Os experimentos foram realizados nos dias 8, 9 e 10 de setembro de 2014. *Não foram observados sobreviventes.....	68
Figura 43.	Efeito da exposição simultânea à radiação solar e aos compostos nas folhas de laranja Valencia (<i>Citrus sinensis</i>). Antes da aplicação dos FS (A), após a aplicação do 8-MOP, extrato bruto 1 (EB1), extrato bruto 3 (EB3), 5,7-dimetoxicumarina (Fr1) e mistura de cumarinas (cumarinas) (B), 2 h depois da aplicação (C), 72 h após a primeira aplicação (D), uma semana após a primeira aplicação (E), três semanas após a primeira aplicação (F).....	70

- Figura 44. Espectros de absorção no UV do 8-MOP na concentração de 50 μM não exposto à radiação solar, após 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h de exposição. As exposições foram feitas das 6 às 18 h, nos dias 24 de março e 17 de abril de 2015. No segundo gráfico, o espectro correspondente a 2 h está sobreposto ao correspondente a 1 h.....72
- Figura 45. Espectro de emissão de fluorescência do 8-MOP na concentração de 50 μM não exposto à radiação solar, após 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 de exposição. As exposições foram feitas das 6 às 18 h dos dias 24 de março e 17 de abril de 2015.....73
- Figura 46. Espectro de absorção no UV do 8-MOP na concentração de 50 μM não exposto à radiação solar, após 30 min, 1 e 2h de exposição. As exposições foram feitas das 11 às 13 h, no dia 24 de março de 2015.....74
- Figura 47. Espectro de emissão de fluorescência do 8-MOP na concentração de 50 μM não exposto à radiação solar, após 30 min, 1 e 2 h de exposição. As exposições foram feitas das 11 às 13 h, nos dias 24 de março e 17 de abril de 2015.....75
- Figura 48. Irradiância espectral solar no UV (280 a 400 nm) dos dias 23 e 30 de abril de 2015 as 12 h.....76
- Figura 49. Sobrevivência dos conídios de *C. acutatum* após o TFA com 8-MOP não exposto, exposto previamente à radiação solar por 6 h e exposto previamente à radiação solar por 12 h. Os conídios foram incubados com as soluções de 8-MOP por 30 min e expostos à radiação solar por 1 h. As barras de erros indicam o desvio padrão. Os experimentos foram realizados nos dias 27, 28 e 29 de abril de 2015. *Não foram observados sobreviventes.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Frações do óleo da casca do limão Tahiti obtidas por cromatografia líquida clássica (CLC).....	10
Tabela 2 –	Frações do óleo essencial do limão Tahiti obtidas por cromatografia líquida a vácuo (CLV).....	11
Tabela 3 –	Frações do óleo essencial de toranja rubi obtidas por cromatografia líquida a vácuo (CLV).....	11
Tabela 4 –	Frações do óleo da casca do limão Tahiti após partição com NH ₄ OH obtidas por cromatografia líquida clássica (CLC).....	13
Tabela 5 –	Composição química da substância da fração Cl.6.p1.....	31
Tabela 6 –	Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C e DEPT obtidos pela análise do espectro da substância 1.....	33
Tabela 7 –	Composição química da substância da fração Cpr.7.p1.....	41
Tabela 8 –	Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C e DEPT obtidos pela análise do espectro da substância 2.....	43
Tabela 9 –	Composição química do extrato bruto 1. *Índice de retenção linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade).....	53
Tabela 10 –	Composição química do extrato bruto 2. *Índice de retenção linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade).....	54
Tabela 11 –	Composição química do extrato bruto 3. *Índice de retenção linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade).....	55
Tabela 12 –	Composição química do extrato bruto 4. *Índice de retenção linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade).....	56
Tabela 13 –	Composição química do extrato bruto 5. *Índice de retenção linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade).....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	Marca registrada
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrometro
¹ O ₂	Oxigênio singlete
8-MOP	8-metoxipsoraleno
AcOEt	Acetato de Etila
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CD ₃ OD	Metanol Deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
Cl.6.p1	5,7-dimetoxicumarina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLC	Cromatografia Líquida clássica
CLV	Cromatografia Líquida a vácuo
cm	Centímetros
Cpr.7.p1	7-hidroxicumarina
<i>d</i>	Dubleto
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Desoxyribonucleic acid)
EM	Espectrometria de Massas
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EtOH	Etanol
eV	Elétron volt
FS	Fotossensibilizador
<i>g</i>	Grama
<i>g</i>	Gravidade
<i>h</i>	Hora(s)
H ₂ O	Água
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
IE-EM	Impacto de elétrons-espectrometria de massa
IF	Inativação Fotodinâmica
IS	Índice de Similaridade
<i>J</i>	Constante de acoplamento (em Hertz)
KOH	Hidróxido de Potássio
L	Litro
LED	<i>Light-emitting diodes</i>
M	Mol L ⁻¹

m	Metro
m/z	Relação massa-carga
MB	Azul de Metileno (<i>Methylene Blue</i>)
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mV	Milivolts
mW	Miliwatts
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
nm	Nanômetros
NMBN	Novo Azul de Metileno (<i>New Methylene Blue N</i>)
°C	Graus Celsius
°C min ⁻¹	Relação graus Celsius por minuto
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PDAY	<i>Potato dextrose agar</i> acrescido com <i>yeast extract</i>
PFC	Podridão floral dos <i>Citrus</i>
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear do Carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singlete
S137	Derivado do azul de metileno não comercial
T ₁	Estado excitado triplete
TBO	Azul de Toluidina O (<i>Toluidine Blue O</i>)
TF	Tratamento Fotodinâmico
TFA	Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano
t _R	Tempo de retenção
TM	Marca registrada
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
UV-Vis	Espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível
v/v	Relação volume-volume
W	Watts
Z	Os substituintes de maior prioridade estão do mesmo lado (Configuração Z)
δ	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. <i>Colletotrichum acutatum</i>	2
1.2. Fotossensibilizadores.....	4
1.3. Inativação fotodinâmica de fungos.....	5
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo Geral.....	8
2.2. Objetivos Específicos.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
I. Extração e Identificação de cumarinas e furanocumarinas.....	9
3.1. Extração de cumarinas de óleos de limão Tahiti, toranja rubi e toranja branca.....	9
3.1.2. Extrato da casca de limão Tahiti preparado por maceração em hexano.....	18
3.2. Elucidação estrutural dos compostos isolados.....	19
3.3. Estudos de espectroscopia de absorção no UV e no visível e espectroscopia de emissão de fluorescência dos compostos utilizados.....	21
II. Inativação fotodinâmica de conídios de <i>Colletotrichum acutatum</i>	21
3.4. Linhagem utilizada e condição de crescimento.....	21
3.4.1. Fotossensibilizadores.....	21
3.4.2. Medidas de irradiância solar no visível e no ultravioleta.....	25
3.5. Avaliação do efeito do tratamento fotodinâmico com azul de metileno e radiação solar na sobrevivência dos conídios.....	25
3.6. Avaliação do efeito do tratamento fotodinâmico com furanocumarinas e cumarinas e radiação solar na sobrevivência dos conídios.....	26

3.7. Efeito do tratamento com os diferentes fotossensibilizadores nas folhas adultas de mudas de laranja Valencia (<i>Citrus sinensis</i>).....	28
3.8. Avaliação do efeito da exposição à radiação solar nos espectros de absorção e emissão de fluorescência do 8-metoxipsoraleno.....	28
3.9. Avaliação da eficácia do 8-metoxipsoraleno no TFA após sua prévia exposição à radiação solar.....	29
3.10. Análise Estatística.....	29
4. RESULTADOS.....	30
I. Extração e identificação de cumarinas e furanocumarinas.....	30
4.1. Extração de cumarinas de óleos de limão Tahiti, e toranja rubi e toranja branca.....	30
4.1.2. Extratos brutos.....	52
II. Inativação fotodinâmica de conídios de <i>Colletotrichum acutatum</i>	60
4.2. Avaliação do efeito do tratamento fotodinâmico com azul de metileno e radiação solar na sobrevivência dos conídios.....	60
4.3. Avaliação do efeito do tratamento fotodinâmico com furanocumarinas e cumarinas e radiação solar na sobrevivência dos conídios.....	64
4.4. Efeito do tratamento com os diferentes fotossensibilizadores nas folhas adultas de laranja Valencia (<i>Citrus sinensis</i>).....	69
4.5. Avaliação do efeito da exposição à radiação solar nos espectros de absorção e emissão de fluorescência do 8-metoxipsoraleno.....	70
4.6. Avaliação da eficácia do 8-metoxipsoraleno no TFA após sua prévia exposição à radiação solar.....	76
5. DISCUSSÃO.....	79
6. CONCLUSÕES.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
APÊNDICES.....	96

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

1.1. *Colletotrichum acutatum*

Colletotrichum é um gênero de fungo ascomiceto (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 diversos hospedeiros, incluindo-se culturas agrícolas de grande importância econômica, como *Citrus*, morango, manga, pêssago, abacate, mirtilo, maracujá, amêndoas, plantas medicinais, arbustos e árvores silvestres. Os fungos podem causar podridões em caules e frutos, seca de ponteiros, manchas foliares, infecções latentes e antracnose (doença que é caracterizada por lesões necróticas profundas e delimitadas nos tecidos) (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004; PERES et al., 2005; LIMA FILHO; OLIVEIRA; MENEZES, 2003; DOMINGUES, 2001; ALMEIDA; COELHO, 2007; De MENEZES et al., 2014b).

Colletotrichum acutatum forma colônias variáveis, de coloração alaranjada e micélios aéreos, geralmente uniformes, de aparência aveludada (ALMEIDA; COELHO, 2007). A reprodução assexuada 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. A dispersão de seus conídios ocorre pela água da chuva ou de irrigação, insetos, vento, utensílios agrícolas e manuseio das culturas (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004; PANDEY; ARORA; DUBEY, 1997; CIAMPI-GUILLARDI et al., 2013; De MENEZES et al., 2015).

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. Nesse caso, geralmente, os frutos aparentam estar saudáveis, manifestando os sintomas da doença apenas após a estocagem, devido à habilidade

das espécies de *Colletotrichum* formar infecções latentes ou quiescentes, nas quais o fungo infecta um fruto não maduro e torna-se dormente até o momento que o fruto amadurece. Após o amadurecimento, o fungo retoma o seu crescimento e causa a doença no fruto (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004).

A antracnose é a principal doença causada por espécies de *Colletotrichum* no pós-colheita, podendo alcançar perdas de 30% dos produtos comercializados (ALMEIDA, 2002; SILVA et al., 2006). A doença é caracterizada pelo aparecimento de lesões arredondadas, grandes, necróticas, com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada. Também pode ocorrer o aparecimento de uma lesão mole, o que prejudica a comercialização dos frutos (SILVA JÚNIOR et al., 2014; LIMA FILHO; OLIVEIRA; MENEZES, 2003). Além da antracnose, espécies de *Colletotrichum* também causam a podridão floral dos *Citrus* (PFC). A doença é comumente associada ao fungo *C. acutatum* e caracteriza-se pela presença de manchas ou lesões laranja-amarronzadas nas pétalas das flores abertas. Após a infecção, os frutos recém-formados caem. (ROBERTO; BORGES, 2001; SILVA JÚNIOR et al., 2014; TIMMER et al., 1994). A PFC foi registrada em quase toda a citricultura das Américas no final das décadas de 70 e 80. A doença atingiu severamente as principais regiões produtoras do Estado de São Paulo nas safras de 1991/92, 1992/93 e 1993/94, causando perdas de até 80% (ROBERTO; BORGES, 2001; SILVA JÚNIOR et al., 2014a,b). O limão Siciliano (*Citrus limom*) e a lima ácida Tahiti (*Citrus latifolia*) 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 Valencia (*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).

A citricultura constitui um importante segmento na estrutura sócioeconômica do Brasil, que, nas últimas décadas, assumiu a liderança mundial na produção de laranjas. O Brasil detém 50% da produção mundial de suco de laranja, exporta 98% do que produz e possui 85% de participação no mercado mundial. Na safra de 2009/2010, a produção brasileira foi de 397 milhões de caixas de laranja de 40,8 kg. A citricultura gera, entre empregos diretos e indiretos, um contingente de 230 mil posições, e uma massa salarial anual

de R\$ 676 milhões (NEVES et al, 2010). Entretanto, na última década, pragas e doenças, como as causadas pelas espécies de *Colletotrichum*, foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores de laranja. 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.

1.2. Fotossensibilizadores

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

Várias classes de FS têm sido testadas para a inativação fotodinâmica de fungos e bactérias. Dentre os FS sintéticos mais utilizados no TFA estão os corantes fenotiazínicos azul de metileno (MB), azul de toluidina (TBO) e o novo azul de metileno (NMBN). Os fenotiazínicos possuem uma boa eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio e têm absorção máxima entre 625 e 660 nm (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005; DONNELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008).

Alguns FS naturais, como os poliacetilenos, tiofenos e psoralenos, são produzidos por diversas espécies de plantas (EBERMANN et al., 1996; MANTHEY; BUSLIG, 2005; BARNES; ANDERSON; PHILLIPSON, 2001; LÓPEZ-CHICÓN et al., 2012). Os psoralenos, também conhecidos como furanocumarinas, são compostos aromáticos tricíclicos presentes em diversas famílias de plantas, como apiaceae, fabaceae e rutaceae, a qual inclui as espécies de *Citrus*. Duas espécies de *Citrus* cultivadas comercialmente, o limão Tahiti (*Citrus latifolia*) e a grapefruit (*Citrus paradisi*), são ricas nesse grupo de substâncias (MANTHEY; BUSLIG, 2005; WILBUR; HAUN, 2005). As furanocumarinas são formadas pela

condensação de um núcleo de cumarina com um anel de furano. Esses compostos são extremamente fototóxicos e a manifestação mais comum dessa toxicidade, em mamíferos, é a fotodermatite, que é uma reação epidérmica caracterizada por erupções bolhosas, hiperpigmentação e eritema. A atividade fototóxica das furanocumarinas também foi observada em bactérias e fungos (ULATE-RODRÍGUEZ et al., 1997; WU; SNYDER, 2003). Os espectros de absorção das furanocumarinas mais comuns apresentam duas bandas a cerca de 250 e 300 nm e um ombro a 330 ou 340 nm, que se estende até 400 nm. Dessa forma, ao contrário da maioria dos FS utilizados no TF do câncer e no TFA clínico, que são excitados pela luz visível, as furanocumarinas são ativadas pela radiação UVA e UVB. Essa característica limita a sua utilização para o tratamento de micoses em animais, mas não é um impedimento para a fotoinativação de fitopatógenos.

Dois mecanismos de ação foram propostos para explicar a atividade fototóxica das cumarinas e furanocumarinas: um mecanismo dependente de oxigênio via processo fotodinâmico, no qual ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio que danificam diversos componentes celulares causando a morte celular, e um mecanismo independente de oxigênio. O último processo ocorre quando as furanocumarinas intercalam-se entre os pares de bases pirimidínicas, acarretando danos e mutações no DNA e, consequentemente, a morte celular (ULATE-RODRÍGUEZ et al., 1997; WU; SNYDER, 2003; SILVA et al., 2014, SONG; TAPLEY JR., 1979). No escuro, o DNA e as furanocumarinas podem formar um complexo intermolecular (não covalente) pela intercalação da molécula da furanocumarina entre os pares de bases de DNA. Após exposição à radiação UVA, em torno de 356 nm, essas moléculas ligam-se covalentemente a bases nitrogenadas (HAMMOND; STOUT; LAMOLA, 1964; POTAPENKO, 1991; SILVA et al., 2014).

1.3. 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; St. DENIS et al., 2011; DAI et al., 2012; VELPULA et al., 2014). O uso do tratamento fotodinâmico para matar estruturas fúngicas, como conídios, ascósporos e micélio, e para o

tratamento de micoses é uma aplicação recente e promissora da técnica (De MENEZES 2014a,b; 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).

Embora diversos aspectos dos mecanismos moleculares da inativação fotodinâmica de fungos responsáveis pelos efeitos biológicos continuem desconhecidos, diversos trabalhos foram realizados, principalmente com espécies de *Candida* (DAI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013) e dermatófitos, como *Tricophyton* (RODRIGUES et al., 2012; SMIJS; PAVEL 2011), para entender como diferentes FS interagem com a célula fúngica. A extensão desses estudos para novas espécies de fungos, como as fitopatogênicas, e a identificação de FS que possam ser utilizados como fungicidas são importantes para a utilização do TFA no controle de fitopatógenos.

Os efeitos do TFA foram estudados majoritariamente em células metabolicamente ativas (principalmente de *C. albicans*). Pouco se sabe a respeito do mecanismo de ação e dos efeitos moleculares do TFA em estruturas fúngicas quiescentes, como conídios e esporos. Os conídios são estruturas especializadas envolvidas na dispersão e, no caso de espécies patogênicas, como *Colletotrichum*, pelo reconhecimento e infecção do hospedeiro (BARROS et al., 2010; De MENEZES et al., 2015). Conídios e esporos diferem de células metabolicamente ativas em relação a características bioquímicas (composição química das diferentes estruturas), fisiológicas (taxa metabólica, resposta ao estresse e expressão de mecanismos de adaptação e defesa) e estruturais (organização de estruturas intracelulares e espessura de parede), que podem influenciar o processo fotodinâmico (GONZALES et al., 2010; BARROS et al., 2010).

A avaliação dos efeitos do tratamento fotodinâmico em fungos fitopatogênicos com o objetivo final de utilizar a técnica para o controle de fitopatógenos em condições de campo representa um aspecto inovador e interessante deste projeto. Os estudos já realizados pelo grupo do Prof. Gilberto U. L. Braga demonstraram que é possível inativar, de maneira muito eficaz, conídios de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* por meio do TFA com FS fenotiazínicos e com cumarinas e furanocumarinas ativadas pela radiação solar. Nenhum FS associado ao TF provocou danos em folhas adultas de mudas de laranja-pera (*Citrus sinensis*), que é um dos hospedeiros do fungo. Os estudos histológicos demonstraram que o TF não provoca danos porque os FS não atravessam a cutícula da folha, que tem aproximadamente 4 µm de espessura (BOARETTO et al., 2003). A eficácia do TF na inativação de fungos fitopatogênicos e a ausência de danos no hospedeiro vegetal são dois pré-requisitos essenciais que estimularam a continuidade dessa linha de pesquisa.

O tratamento fotodinâmico apresenta algumas vantagens importantes em relação à quimioterapia com os fungicidas convencionais. Por exemplo, devido aos múltiplos e variáveis alvos das espécies reativas de oxigênio que são geradas no TF, a probabilidade de ocorrer a seleção de linhagens tolerantes é reduzida. Adicionalmente, o TF, além de matar células metabolicamente ativas, é capaz de fotoinativar estruturas dormentes, como os conídios. (De SOUZA et al., 2006; DONNELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008; BERNAL et al., 2011; De MENEZES et al, 2014b). Além disso, a contaminação do meio ambiente e de produtos industrializados por fungicidas é motivo de constante preocupação. Normas cada vez mais restritivas têm sido utilizadas para avaliar a qualidade dos produtos agrícolas. Em 2012, lotes de suco de laranja produzidos no Brasil não puderam entrar nos Estados Unidos por apresentarem níveis do fungicida carbendazin acima do permitido. (De MENEZES et al 2014b; EXAME, 2012). Os fotossensibilizadores utilizados no tratamento fotodinâmico são muito menos tóxicos para humanos e animais e são menos danosos ao meio ambiente do que a maioria dos fungicidas aprovados para uso agrícola.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento fotodinâmico com FS sintéticos e naturais em conídios do fungo fitopatogênico *Colletotrichum acutatum*.

2.2. Objetivos específicos

- (a) Isolar, identificar e caracterizar cumarinas e furanocumarinas extraídas de espécies de *Citrus*.
- (b) Avaliar o potencial das cumarinas e furanocumarinas extraídas das espécies de *Citrus*, para fotoinativar conídios de *Colletotrichum acutatum*.
- (c) Comparar os efeitos do TFA com cumarinas e furanocumarinas com os efeitos do TFA com FS fenotiazínicos.
- (d) Avaliar os efeitos do tratamento fotodinâmico com os diferentes FS nas folhas da planta hospedeira laranja Valencia (*Citrus sinensis*).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

I. Extração e identificação de cumarinas e furanocumarinas

3.1. Extração de cumarinas de óleos de limão Tahiti, toranja rubi e toranja branca

As extrações de cumarinas foram realizadas no laboratório de Farmacognosia da FCFRP/USP, sob a supervisão do Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos e da Dra. Ana Carolina Pereira. Os óleos (da casca e o essencial) do limão Tahiti foram fornecidos pela empresa Citrosuco (Grupo Fischer, Matão, SP), e os óleos essenciais das toranjas rubi e branca foram obtidos pela empresa Dierberger (Dierberger Óleos Essenciais S.A., Barra Bonita, SP). Para a extração das cumarinas, 50 mL desses óleos foram dissolvidos em 300 mL de Acetato de Etila (AcOEt) (Synth, Brasil). A mistura foi transferida para funil de separação e particionada três vezes com 300 mL de solução hidroalcoólica de KOH [(70% de solução de KOH (Synth, Brasil) 5 M e 30% de etanol (Quemis - Hexis científica, Brasil) volume-volume]. A fase aquosa foi acidificada até pH 1 com solução H₂SO₄ (Quemis - Hexis científica, Brasil) 5 M e particionada três vezes com 300 mL de AcOEt para cada partição. As frações orgânicas foram reunidas e concentradas a vácuo. Para detecção das furanocumarinas e cumarinas, submeteram-se as amostras à cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) em placas de alumínio com fase estacionária de sílica gel 60 F₂₅₄ 20 × 20 cm (Merck, Alemanha). Para a eluição foram utilizadas como fase móvel hexano/AcOEt e hexano/acetona (Synth, Brasil), na proporção de 7:3. A revelação das placas cromatográficas 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. As cumarinas e furanocumarinas são vistas sob luz UV nas cores azul, amarela ou violeta. Essas cores podem variar de acordo com a natureza e posição dos grupos substituintes (SIMÕES; SCHENKEL; GOSMANN, 1999; AMARAL et al., 2009). Para a separação das cumarinas e furanocumarinas foram utilizados 20 g do extrato bruto obtido do óleo da casca do limão Tahiti, 23,11 g do extrato bruto do óleo essencial do limão Tahiti e 16,77 g do extrato de toranja rubi. A separação foi realizada por meio de cromatografia líquida clássica (CLC) e cromatografia líquida a vácuo (CLV). Como fases estacionárias, foram utilizadas sílica gel 60 (0,060 × 0,200 mm, 60 A) e sílica gel 60 (0,04 × 0,063 mm, 60 A) (ambas da Merck, Alemanha) para a CLC e CLV, respectivamente, e, como fase móvel, o sistema hexano/AcOEt, em gradiente crescente de polaridade como descrito nas Tabelas 1, 2 e 3. Ao final do processo foram utilizados AcOEt e/ou metanol (Synth, Brasil) para eluição dos compostos polares retidos na fase estacionária. O extrato bruto obtido do óleo essencial da toranja branca não foi submetido às separações por CLC ou CLV.

Tabela 1 – Frações do extrato bruto do óleo da casca do limão Tahiti obtidas por cromatografia líquida clássica (CLC)

Fração	Proporção da fase móvel	Volume (mL)	Massa obtida (g)
1	100% Hexano	1500	0,0465
2	95/5% - Hexano/AcOEt	1500	0,4245
3	90/10% - Hexano/AcOEt	1500	0,4597
4	85/15% - Hexano/AcOEt	1500	0,0875
5	80/20% - Hexano/AcOEt	1500	1,0701
6	75/25% - Hexano/AcOEt	1500	0,1613
7	70/30% - Hexano/AcOEt	1500	0,5103
8	65/35% - Hexano/AcOEt	1500	0,7508
9	60/40% - Hexano/AcOEt	1500	0,6658
10	55/45% - Hexano/AcOEt	1500	0,3702
11	50/50% - Hexano/AcOEt	1500	0,1050
12	100% AcOEt	2000	0,1094

Tabela 2 – Frações do extrato bruto do óleo essencial do limão Tahiti obtidas por cromatografia líquida a vácuo (CLV)

Fração	Proporção da fase móvel	Volume (mL)	Massa obtida (g)
1	100% Hexano	1500	0,0167
2	95/5% - Hexano/AcOEt	1500	0,0395
3	90/10% - Hexano/AcOEt	1500	0,3233
4	85/15% - Hexano/AcOEt	1500	1,0423
5	80/20% - Hexano/AcOEt	1500	1,0783
6	75/25% - Hexano/AcOEt	1500	0,5312
7	70/30% - Hexano/AcOEt	1500	0,0935
8	65/35% - Hexano/AcOEt	1500	0,0816
9	60/40% - Hexano/AcOEt	1500	0,0442
10	55/45% - Hexano/AcOEt	1500	0,0465
11	50/50% - Hexano/AcOEt	1500	0,0230
12	100% AcOEt	2000	0,1677

Tabela 3 – Frações do extrato bruto do óleo essencial de toranja rubi obtidas por cromatografia líquida a vácuo (CLV)

Fração	Proporção da fase móvel	Volume (mL)	Massa obtida (g)
1	100% Hexano	1500	0,0010
2	95/5% - Hexano/AcOEt	1500	0,0254
3	90/10% - Hexano/AcOEt	1500	0,1103
4	85/15% - Hexano/AcOEt	1500	0,1763
5	80/20% - Hexano/AcOEt	1500	0,0631
6	75/25% - Hexano/AcOEt	1500	0,1473
7	70/30% - Hexano/AcOEt	1500	0,0592
8	65/35% - Hexano/AcOEt	1500	0,1038
9	60/40% - Hexano/AcOEt	1500	0,1438
10	55/45% - Hexano/AcOEt	1500	0,0581
11	50/50% - Hexano/AcOEt	1500	0,0805
12	100% AcOEt	2000	0,1689
13	100% MeOH	1000	0,0693

As frações 7, 8, 9 e 10 obtidas do óleo essencial da toranja rubi foram reunidas por apresentarem tempos de retenção e fluorescências iguais, nas análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) em placas de alumínio, com fase estacionária de sílica gel 60 F₂₅₄ 20 × 20 cm (Merck, Alemanha). A fração foi denominada fração 7, tendo peso de 0,3442 g.

Cada fração foi concentrada a vácuo e submetida à CCDC utilizando-se a fase móvel hexano/acetona na proporção de 7:3. A revelação das placas cromatográficas foi realizada com radiação ultravioleta a 254 nm e 366 nm. Em seguida, utilizou-se como revelador químico a solução hidroalcoólica de KOH 1 M.

Na tentativa de aprimorar a extração dessas substâncias, foi feita uma nova partição com o óleo da casca do limão Tahiti. Para tanto, 100 mL do óleo foram dissolvidos em 600 mL de AcOEt, os quais foram transferidos para funil de separação e particionados quatro vezes com 600 mL de solução de NH₄OH (Synth, Brasil) e duas vezes com água destilada. A fase aquosa alcalina foi acidificada até pH 1 com H₂SO₄ 5 M e particionada três vezes com 600 mL de AcOEt para cada partição. As frações orgânicas foram reunidas e concentradas a vácuo, obtendo-se 79,37 g de extrato bruto. Para detecção das furanocumarinas e cumarinas presentes, as amostras foram submetidas à CCDC, utilizando-se a fase móvel hexano/AcOEt e hexano/acetona, na proporção de 7:3. A revelação das placas cromatográficas 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.

Uma alíquota de 61,5 g do extrato bruto foi submetida à CLC com sílica gel 60 (0,060 × 0,200 mm, 60 A, Merck, Alemanha), obtendo-se as frações apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Frações do extrato bruto do óleo da casca do limão Tahiti após partição com NH_4OH obtidas por cromatografia líquida clássica (CLC)

Fração	Proporção da fase móvel	Volume (mL)	Massa obtida (g)
1	100% Hexano	1000	0,0097
2	95/5% - Hexano/AcOEt	600	1,3158
3	90/10% - Hexano/AcOEt	600	0,6976
4	85/15% - Hexano/AcOEt	600	0,5138
5	80/20% - Hexano/AcOEt	600	1,2944
6	75/25% - Hexano/AcOEt	600	0,9753
7	70/30% - Hexano/AcOEt	600	0,4492
8	65/35% - Hexano/AcOEt	600	0,3168
9	60/40% - Hexano/AcOEt	600	0,3569
10	55/45% - Hexano/AcOEt	600	0,0367
11	50/50% - Hexano/AcOEt	600	0,1673
12	100% AcOEt	1000	0,3969
13	100% MeOH	800	1,9403

Cada fração foi concentrada a vácuo e submetida à CCDC, utilizando-se como fase móvel hexano/acetona, na proporção de 7:3. A revelação das placas cromatográficas foi realizada com radiação ultravioleta a 254 nm e 366 nm. Em seguida, utilizou-se como revelador químico a solução hidroalcoólica de KOH 1 M.

Após a revelação das placas foi observado que as frações 6 do óleo da casca do limão Tahiti particionado com NH_4OH e a fração 7 do óleo essencial de toranja rubi possuíam fluorescências características de cumarinas e/ou furanocumarinas e apresentavam-se quase puras. Essas frações foram analisadas em CLAE analítico para avaliar a resolução dos picos e a separação foi otimizada, utilizando-se CLAE semipreparativo. A análise foi feita utilizando-se a coluna analítica Polar-RP com poros de tamanho 4 μm , dimensões de 150 $\times$ 4,60 mm (Sinergy, Phenomenex Inc., CA, EUA). Foram injetados 20 μL (1 mg mL^{-1}) de cada fração dissolvidas em acetonitrila/MeOH grau cromatográfico (Merck, Alemanha) na proporção de 1:1, utilizando-se um aparelho de CLAE (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com injetor automático (SIL-10AD), detector DAD (*Diode Array Detector*) (SPD-M10CA), sistema ternário de solventes (LC-10AD) e degaseificador (DGU-14A). Utilizou-se o Software Class-VP para acompanhar as análises. Como fase móvel foram utilizados solventes

grau cromatográfico MeOH/água (Merck, Alemanha) em modo gradiente, iniciando com 31% do solvente B, subindo linearmente para 100% aos 40 min, mantendo 100% aos 45 min, descendo linearmente para a condição inicial de 31% aos 47 min e mantendo 31% aos 52 min, com detecção em 270 e 360 nm. A vazão foi de 1 mL min⁻¹.

Os tempos de retenção e resolução dos picos das amostras podem ser observados nas Figuras 1 e 2.

Figura 1. Cromatograma obtido em CLAE da fração 6 do óleo da casca do limão Tahiti em MeOH/H₂O (gradiente), com detecção em 360 nm

Figura 2. Cromatograma obtido em CLAE da fração 7 do óleo essencial da toranja rubi em MeOH/H₂O (gradiente), com detecção em 360 nm

A separação dos compostos foi feita utilizando-se uma coluna preparativa Polar-RP, com tamanho de poros de 4 μm (Sinergy, Phenomenex Inc., CA, EUA), dimensões de 250 $\times$ 21,20 mm. Foram feitas dez injeções para a fração 6 do óleo da casca de limão Tahiti e quatro injeções para a fração 7 do óleo essencial de toranja rubi, sendo cada injeção de 500 μL (60 mg mL^{-1}). O método utilizado foi o mesmo descrito anteriormente, utilizando-se um aparelho de CLAE (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com injetor manual, detector UV-Vis (SPD-20A), sistema binário de solventes (LC-6AD), degaseificador (DGU-20A5) e coletor automático de frações (FRC-10A). Utilizaram-se o Software LC-Solutions e vazão de 15 mL min^{-1} .

Após a separação, as amostras foram denominadas Cl.6.p1 (óleo da casca do limão Tahiti, pico 1 da fração 6), Cl.6.p2 (óleo da casca do limão Tahiti, pico 2 da fração 6), Cpr.7.p1 (óleo essencial de toranja rubi pico 1 da fração 7), Cpr.7.p2 (óleo essencial de toranja rubi pico 2 da fração 7). Tais amostras foram submetidas ao CLAE analítico, nas mesmas condições apresentadas. As Figuras 3, 4, 5 e 6 mostram os cromatogramas das frações Cl.6.p1, Cl.6.p2, Cpr.7.p1 e Cpr.7.p2, respectivamente.

Figura 3. Cromatograma obtido em CLAE da fração Cl.6.p1 do óleo da casca do limão Tahiti em MeOH/H₂O (gradiente), com detecção em 360 nm

Figura 4. Cromatograma obtido em CLAE da fração Cl.6.p2 do óleo essencial do limão Tahiti em MeOH/H₂O (gradiente), com detecção em 360 nm

Figura 5. Cromatograma obtido em CLAE da fração Cpr.7.p1 do óleo essencial da toranja rubi em MeOH/H₂O (gradiente), com detecção em 360 nm

Figura 6. Cromatograma obtido em CLAE da fração Cpr.7.p2.do óleo essencial da toranja rubi em MeOH/H₂O (gradiente), com detecção em 360 nm

As frações purificadas apresentaram massas de 0,0131 g (Cl.6.p1), 0,0113 g (Cl.6.p2), 0,0140 g (Cpr.7.p1) e 0,0073 g (Cpr.7.p2). Após a purificação, todas as frações foram enviadas para análise por RMN ¹H (Ressonância Magnética de Hidrogênio), RMN ¹³C (Ressonância Magnética do Carbono-13) e HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*), bem como para análises por CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas).

3.1.2. Extrato da casca de limão Tahiti preparado por maceração em hexano

Para comparação com os demais óleos obtidos da indústria citrícola, foi produzido no laboratório um extrato a partir da casca de seis limões Tahiti adquiridos no comércio local.

Os limões foram descascados, de maneira a evitar que fosse retirado o albedo dos frutos. As cascas foram secas em estufa com circulação a aproximadamente 45°C por 3 h. Após a secagem, as cascas foram moídas em um pequeno moinho de café (Cadence MDR 301), resultando em uma massa de 20,44 g de pó. O pó foi, então, macerado com 200 mL de hexano (Synth, Brasil) e deixado em descanso por 48 h. Essa etapa foi repetida três vezes.

Após a terceira maceração, a mistura foi filtrada e o solvente concentrado a vácuo, fornecendo 5 mL de extrato oleoso.

Para obtenção do extrato bruto, foram adotados os mesmos procedimentos empregados com os óleos comerciais. Foi realizada a dissolução do volume total do óleo em 30 mL de AcOEt. A mistura foi transferida para funil de separação e particionada três vezes com 30 mL de solução hidroalcoólica de hidróxido de potássio [70% de solução de KOH 5 M e 30% de etanol (v/v)]. A fase aquosa foi acidificada até pH 1 com solução de H₂SO₄ 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, submeteu-se a amostra à cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) em placa de alumínio com fase estacionária de sílica gel 60 F₂₅₄ 20 × 20 cm. Para a eluição foram utilizadas como fase móvel hexano/AcOEt e hexano/acetona, na proporção de 7:3. A revelação das placas cromatográficas foi realizada com radiação ultravioleta a 254 nm e 366 nm. Em seguida, utilizou-se como revelador químico a solução hidroalcoólica de KOH 1 M.

Após a obtenção de todos os extratos, eles foram denominados extrato bruto 1 (extrato do óleo da casca do limão Tahiti obtido da partição com NH₄OH), extrato bruto 2 (extrato do óleo essencial do limão Tahiti), extrato bruto 3 (extrato das cascas dos limões Tahiti macerados em hexano), extrato bruto 4 (extrato do óleo essencial da toranja rubi) e extrato bruto 5 (extrato do óleo essencial da toranja branca).

3.2. Elucidação estrutural dos compostos isolados

Para a elucidação dos compostos isolados, as frações Cl.6.p1, Cl.6.p2, Cpr.7.p1 e Cpr.7.p2 foram submetidas à RMN ¹H, RMN ¹³C e HMQC. Os espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C e HMQC foram obtidos utilizando-se o equipamento Bruker DPX 400 com frequência de 500 e 400 MHz. Foi utilizado clorofórmio deuterado (CDCl₃) (Merck, Alemanha) para obtenção dos espectros das frações Cl.6.p1 e Cl.6.p2, e metanol deuterado (CD₃OD) para a obtenção dos espectros das frações Cpr.7.p1 e Cpr.7.p2. As análises foram realizadas no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP (FFCLRP-USP).

Tanto as frações como os extratos obtidos foram submetidos à análise em CG-EM. Os espectros de massas foram obtidos por meio de um QP2010Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), equipado com injetor automático AOC-20i, fonte de ionização por elétrons (IE-EM) e analisador quadrupolar do tipo filtro de massas. Para a dissolução da amostra foi utilizado acetato de etila grau espectroscópico (Mallinkrodt). A separação cromatográfica foi

realizada em coluna capilar Rtx5-MS (Restek) de sílica fundida (30 m × 0,25 mm d. i. × 0,25 µm de filme), composta de 5% de difenilpolisiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano. Foi utilizado hélio (99,999%) como gás de arraste, com vazão constante de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura do injetor foi de 240°C e o volume de injeção foi de 0,1 µL. A temperatura do forno foi programada de 60°C a 240°C a uma velocidade de 3°C min⁻¹. A amostra eluída da coluna cromatográfica foi direcionada pelo divisor de fluxo para a fonte de ionização, na razão de 1:20. A temperatura da fonte foi ajustada em 280°C e a energia do feixe de elétrons foi de 70 eV. O analisador foi controlado para separar íons de m/z entre 40 e 600. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os das Bibliotecas Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2, por meio do software GCMS Solution (Shimadzu, Japão), que forneceu o índice de similaridade (IS), expresso em porcentagem, a partir do qual foi feita a identificação dos constituintes químicos. As análises foram feitas no laboratório do Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti, do Departamento de Química da FFCLRP/USP.

Além da comparação dos espectros de massas por meio do índice de similaridade, os constituintes químicos dos extratos brutos foram comparados a índices de retenção (IR) da literatura. Para isso, duas misturas de padrões de n-Alcanos (C₈-C₂₀ e C₂₁-C₄₀, ambas da Sigma-Aldrich) foram utilizadas para verificar o desempenho do sistema CG-EM e calcular o índice de retenção linear (*Linear Retention Index*, LRI) de cada composto na amostra. Os padrões (2 µL) de alcanos foram injetados no sistema CG-EM, operando nas condições descritas acima, e seus respectivos tempos de retenção foram usados como padrão externo de referência para o cálculo do LRI, juntamente com os tempos de retenção de cada composto de interesse. O LRI de cada componente foi calculado conforme a Equação 1 (VIEGAS; BASSOLI, 2007):

$$\text{LRI} = 100 * N \left(\frac{T_x - T_{n-1}}{T_n - T_{n-1}} \right) + 100 * C_{n-1} \quad (1)$$

Onde: LRI - índice de retenção linear; T_x - tempo de retenção do composto de interesse; T_n - tempo de retenção do hidrocarboneto posterior ao tempo de retenção do composto de interesse; T_{n-1} - tempo de retenção do hidrocarboneto anterior ao tempo de retenção do composto de interesse; N - número de carbonos do hidrocarboneto anterior subtraído do número de carbonos do hidrocarboneto posterior; C_{n-1} - número de carbonos do hidrocarboneto anterior.

Os índices de retenção linear calculados foram comparados com valores encontrados na literatura para colunas de mesma polaridade.

3.3. Estudos espectroscópicos no estado estacionário dos compostos utilizados

Foram feitas medidas de espectroscopia de absorção, utilizando-se o espectrofotômetro Amersham Ultrospec™ 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 comprimentos de onda de excitação entre 200 e 750 nm. A captação da emissão de fluorescência foi feita no intervalo entre 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. Inativação Fotodinâmica de conídios de *Colletotrichum acutatum*

3.4. Linhagem utilizada e condição de crescimento

Os experimentos foram realizados com a linhagem CA 142 de *Colletotrichum acutatum* isolada de *Citrus*, que foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior, do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

O fungo cresceu em meio de cultura “Potato Dextrose Agar” (PDA) (Acumedia Manufacturers, Inc. Lansing, MI, EUA), suplementado com extrato de levedura 1 g L⁻¹ (*Bacto*™ yeast extract, Difco BD, EUA) a 28°C, por 5 dias, com fotoperíodos 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 (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA) e a concentração da suspensão foi determinada por contagens em hematímetro.

3.4.1. Fotossensibilizadores

Os conídios foram fotossensibilizados com os produtos comerciais: (1) corante fenotiazínico azul de metileno (methylene blue, MB) (C₁₆H₁₈ClN₃S) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA); (2) furanocumarina 8-metoxipsoraleno (8-methoxypsoralen, 8-MOP) (C₁₂H₈O₄) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA) e (3) cumarina (2*H*-chromen-2-one) (C₉H₆O₂) (Synth,

Brasil). Também foram avaliados: (1) uma fração extraída do óleo da casca de limão Tahiti (Cl.6.p1), (2) uma fração extraída do óleo essencial de toranja rubi (Cpr.p1), (3) duas frações extraídas a partir de um resíduo do processamento industrial do limão Tahiti por De Menezes e colaboradores (2014a) e (4) extratos brutos não puros obtidos a partir de óleos essenciais e da casca de limão Tahiti e toranjas rubi e branca. Os dados espectroscópicos sugeriram que a fração Cl.6.p1 é constituída pela cumarina 5,7-dimetoxicumarina ($C_{11}H_{10}O_4$), e a fração Cpr.p1 é constituída pela cumarina 7-hidroxycumarina ($C_9H_6O_3$). As frações extraídas do resíduo foram identificadas como a furanocumarina isopimpinellina (5,8-dimetoxipsoraleno) ($C_{13}H_{10}O_5$) e uma mistura de cumarinas constituída por 7-metoxicumarina ($C_{10}H_8O_3$) e 5,7-dimetoxicumarina ($C_{11}H_{10}O_4$) na proporção de 3:1 (De MENEZES et al., 2014a). O isolamento das frações Cl.6.p1, Cpr.p1 e a identificação dos seus constituintes foram feitos durante o presente trabalho. As estruturas químicas das moléculas são mostradas na Figura 7 e os seus respectivos espectros de absorção são apresentados nas Figuras 8 a 11.

Foram preparadas soluções-estoque dos extratos brutos e da mistura de cumarinas em dimetilsulfóxido (*Dimethyl Sulfoxide*, DMSO) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA), com concentrações 200 vezes maiores (2.500 mg L^{-1}) do que a concentração utilizada. As soluções-estoque dos compostos puros também foram preparadas em DMSO e com concentrações 100 vezes maiores ($5.000 \text{ }\mu\text{M}$) do que a concentração utilizada. Todas as soluções foram aliquotadas e mantidas no escuro à temperatura ambiente por até duas semanas. As soluções-estoque do MB foram preparadas em água destilada com concentração 10 vezes maior ($500 \text{ }\mu\text{M}$) do que a concentração utilizada. As soluções de MB foram aliquotadas e mantidas no escuro, a -18°C , por até duas semanas.

Figura 7. Estrutura química dos FS utilizados no estudo. (A) 5,7-dimetoxicumarina, (B) 7-hidroxycumarina, (C) 8-metoxipsoraleno, (D) cumarina, (E) isopimpinelina, (F) mistura de (1) 7-metoxicumarina e (2) 5,7-dimetoxicumarina (3:1) e (G) azul de metileno

Figura 8. Espectro de absorção no visível do azul de metileno. O espectro foi obtido na concentração de 50 μM

Figura 9. Espectro de absorção no ultravioleta do 8-MOP e da cumarina. Os espectros foram obtidos na concentração de 50 μM

Figura 10. Espectro de absorção no ultravioleta das frações isoladas do óleo da casca de limão Tahiti (5,7-dimetoxicumarina) e do óleo essencial de toranja rubi (7-hidroxycumarina). Os espectros foram obtidos na concentração de 50 μM

Figura 11. Espectro de absorção no ultravioleta dos extratos brutos obtidos dos óleos essenciais e da casca de limão Tahiti e toranjas rubi e branca. Os espectros foram obtidos na concentração de $12,5 \text{ mg L}^{-1}$

3.4.2. Medidas da irradiância solar no visível e no ultravioleta

As excitações de todas as substâncias avaliadas foram feitas por meio de exposições à radiação solar. As irradiâncias foram medidas utilizando-se uma sonda de irradiância (CC-3-UV, Ocean Optics, Dunedin, FL, EUA) enroscada no final de uma fibra óptica acoplada a um espectroradiômetro USB4000 (Ocean Optics, Dunedin, FL) pelo Prof. Dr. Luciano Bachmann, do Departamento de Física da FFCLRP/USP.

3.5. Avaliação do efeito do tratamento fotodinâmico com azul de metileno e radiação solar na sobrevivência dos conídios

Em microtubos de 2 mL (polipropileno, Axygen Scientific, CA, EUA), foram colocados 500 μL de suspensão de conídios e 500 μL de solução do FS. As concentrações finais nas misturas foram 2×10^6 conídios mL^{-1} e 50 μM de MB. Os microtubos foram mantidos no escuro por 30 min (pré-incubação). Em seguida, 1000 μL de cada suspensão foram colocados em placas de cultura de células com 24 poços (poliestireno, TPP, Suíça) e expostos à radiação solar por 30 min, 1 e 2 h. Os experimentos foram conduzidos entre 11 e 13 h dos dias 16, 17 de junho e 14 de julho de 2014 em Ribeirão Preto, SP (latitude: $21^\circ 10' 39''$ S, longitude: $47^\circ 48' 37''$ W, altitude: 546 m). Durante as exposições, as placas 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. Após as exposições, as suspensões foram agitadas e diluídas (10^{-1} a 10^{-2}) 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 o monitoramento do 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 estendida até 7 dias.

Três diferentes tipos de placas-controle foram preparados em todos os experimentos: (1) controles em que os conídios foram expostos à radiação solar, mas não foram tratados com o FS (-FS+L), (2) controles em que os conídios foram tratados com o FS, mas foram expostos à radiação solar (+FS-L) e (3) controles em que os conídios não foram tratados com o FS e não foram expostos à radiação solar (-FS-L). Os efeitos dos tratamentos foram determinados por meio da fração de sobreviventes. O efeito da radiação solar foi calculado dividindo-se a média (M) do número de UFC das placas cujos conídios foram expostos apenas à radiação solar pela média do número de UFC das placas cujos conídios não foram expostos à radiação solar e nem tratados com o FS. Dessa forma a fração de sobrevivência foi determinada por: M_{-FS+L}/M_{-FS-L} . O efeito do FS (toxicidade no escuro) foi calculado dividindo-se a média do número de UFC das placas cujos conídios foram tratados com o FS e não expostos à radiação solar pela média do número de UFC das placas cujos conídios não foram expostos à radiação solar e nem tratados com o FS. A fração de sobreviventes foi, então, determinada por: M_{+FS-L}/M_{-FS-L} . O efeito do TFA foi calculado dividindo-se a média do número de UFC das placas cujos conídios foram expostos à radiação solar e tratados com os FS pela média do número de UFC das placas cujos conídios foram expostos à radiação solar e não tratados com os FS. Sendo assim, a fração de sobreviventes foi determinada por: M_{+FS+L}/M_{-FS+L} . Os conídios que não originaram colônias após 7 dias foram considerados mortos pelo tratamento.

3.6. Avaliação do efeito do tratamento fotodinâmico com furanocumarinas e cumarinas e radiação solar na sobrevivência dos conídios

Em microtubos de 2 mL (polipropileno, Axygen Scientific), foram colocados 1300 µL de suspensão de conídios, 13 µL de solução dos compostos: (1) 8-MOP; (2) cumarina; (3) 5,7-dimetoxicumarina; (4) 7-hidroxycumarina; (5) isopimpinellina ou 6,5 µL de solução dos compostos (6) mistura de cumarinas, (7) extrato bruto 1 (obtido óleo da casca do limão Tahiti), (8) extrato bruto 2 (obtido do óleo essencial de limão Tahiti); (9) extrato bruto 3 (obtido do óleo das cascas dos limões maceradas em hexano); (10) extrato bruto 4 (obtido

óleo essencial de toranja rubi) e (11) extrato bruto 5 (obtido do óleo essencial de toranja branca). A concentração final de conídios nas misturas foi 4×10^6 conídios mL^{-1} . As concentrações finais das substâncias puras foram de 50 μM (as concentrações em g L^{-1} de cumarina, 8-MOP, isopimpinellina, 5,7-dimetoxicumarina e 7-hidroxycumarina foram 7,31 mg L^{-1} , 10,8 mg L^{-1} , 12,3 mg L^{-1} , 10,3 mg L^{-1} e 5,7 mg L^{-1} , respectivamente). Para as misturas, as concentrações finais foram de 12,5 mg L^{-1} . A concentração final do DMSO nas misturas foi sempre 1%. Os microtubos foram mantidos no escuro por 30 min (pré-incubação). Em seguida, 1000 μL de cada suspensão foram colocados em placas de cultura de células de 24 poços (poliestireno, TPP) e expostos à radiação solar por 1 h. Todos os experimentos foram conduzidos entre 11 e 12 h, em Ribeirão Preto, SP. Os extratos brutos foram avaliados nos dias 08, 09 e 10 de setembro de 2014, as frações isoladas foram avaliadas nos dias 14, 15 e 29 de outubro de 2014, e o 8-MOP e a cumarina foram avaliados todos os dias. As placas foram cobertas com filme de diacetato de celulose durante as exposições. Após as exposições, as suspensões foram agitadas e diluídas (10^{-1} a 10^{-2}) 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 (Fluka, Itália), em placas de Petri (60 $\times$ 15 mm). Foram preparadas três placas-réplica por tratamento. As microplacas foram incubadas a 28°C, no escuro, e a contagem das colônias foi iniciada após 24 h, com auxílio de estereomicroscópio (com ampliação de 8 $\times$), e estendida até 7 dias. Como descrito no item 3.5, três diferentes tipos de placas controle foram preparadas em todos os experimentos: (1) controle -FS+L, (2) controle +FS-L, (3) controle -FS-L. Os efeitos dos tratamentos foram determinados por meio da porcentagem de sobreviventes. O efeito da radiação solar foi calculado dividindo-se a média do número de UFC das placas cujos conídios foram expostos apenas à radiação solar pela média do número de UFC das placas cujos conídios não foram expostos à radiação solar e não tratados com o FS. Dessa forma, a porcentagem de sobrevivência foi determinada por: $(M_{\text{FS+L}}/M_{\text{FS-L}}) \times 100$. O efeito do FS (toxicidade no escuro) foi calculado dividindo-se a média do número de UFC das placas cujos conídios foram tratados com o FS e não expostos à radiação solar pela média do número de UFC das placas cujos conídios não foram expostos à radiação solar e não tratados com o FS. A porcentagem de sobreviventes foi, então, determinada por $(M_{\text{+FS-L}}/M_{\text{FS-L}}) \times 100$. O efeito do TFA foi calculado dividindo-se a média do número de UFC das placas cujos conídios foram expostos à radiação solar e tratados com o FS pela média do número de UFC das placas cujos conídios foram expostos à radiação solar e não tratados com o FS. Sendo assim, a porcentagem de sobreviventes foi determinada por

$(M_{+FS+L}/M_{-FS+L}) \times 100$. Os conídios que não originaram colônias após 7 dias foram considerados mortos pelo tratamento.

3.7. Efeito do tratamento com os diferentes fotossensibilizadores nas folhas adultas de mudas de laranja Valencia (*Citrus sinensis*)

Mudas com aproximadamente 1,7 m de altura foram adquiridas do Fundo de defesa da citricultura (Fundecitrus, Araraquara, SP). Para avaliar os efeitos da aplicação dos FS nas folhas da laranja, 5 µL de soluções de (1) 8-MOP e (2) 5,7-dimetoxicumarina, ambas na concentração 50 µM; (3) extrato bruto 1 (obtido do óleo da casca do limão Tahiti); (4) extrato bruto 3 (obtido do óleo das cascas de limão Tahiti maceradas em hexano) e (5) mistura de cumarinas, todos na concentração 12,5 mg mL⁻¹, foram aplicados na superfície superior (adaxial) das folhas. As soluções foram reaplicadas a cada 3 dias, durante 21 dias. Durante o período, as plantas foram mantidas ao ar livre, expostas à radiação solar. As plantas foram avaliadas visualmente, a olho nu, para verificar a ocorrência de danos durante o transcorrer do experimento. As avaliações foram feitas em três folhas por planta, em três plantas diferentes. O experimento foi realizado entre os dias 14 de novembro e 5 de dezembro de 2014.

3.8. Avaliação do efeito da exposição à radiação solar nos espectros de absorção e emissão de fluorescência do 8-metoxipsoraleno

A exposição do FS a altas irradiâncias pode alterar a estrutura da molécula o que, consequentemente, poderá alterar seu espectro de absorção e emissão. Para tanto, 10 mL de solução 50 µM de 8-MOP em solução 0,01% (v/v) de Tween[®] 80 foram colocados em placas de Petri descartáveis (60 × 15 mm) (poliestireno, J. Prolab), cujas tampas foram substituídas por filmes de triacetato de celulose com 0,13 mm de espessura (0.13-mm-thick premium cellulose triacetate; Liard Plastics, Salt Lake City, UT). As placas foram expostas à radiação solar nos dias 24 de março e 17 de abril de 2015, das 6 às 18 h. Em ambos os dias, o céu estava claro, sem a presença de nebulosidade. Após 0, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h, uma das placas foi removida, o volume da solução foi ajustado para 10 mL com água destilada. Uma alíquota de 1 mL das soluções foi utilizada para a obtenção dos espectros de absorção e de emissão de fluorescência com descrito anteriormente no item 3.3. Em ambos os dias, também foram feitas exposições de 30 min, 1 e 2 h à radiação solar a partir das 11 h.

3.9. Avaliação da eficácia do 8-metoxipsoraleno no TFA após sua prévia exposição à radiação solar

A exposição de FS a altas irradiâncias pode reduzir a sua atividade. Foram avaliados os efeitos da exposição à radiação solar na atividade fotossensibilizadora do 8-MOP e sua eficácia em inativar conídios de *C. acutatum*. A eficácia do TFA com 8-MOP previamente exposto à radiação solar por 6 e 12 h, no dia 24 de março, foi avaliada. Em microtubos de 2 mL (polipropileno, Axygen Scientific, CA, EUA) foram colocados 1300 µL de suspensão de conídios preparada em Tween[®] 80 (0,01%). Os conídios foram centrifugados a 3561 g, por 4 min, o sobrenadante foi descartado e os conídios foram ressuspensos em soluções 50 µM de 8-MOP (1) não exposto ao sol; (2) exposto previamente à radiação solar por 6 h e (3) exposto previamente à radiação solar por 12 h. A concentração final de conídios na mistura foi 4×10^6 conídios mL⁻¹. Os tubos foram mantidos no escuro por 30 min (pré-incubação) e, em seguida, 1000 µL de cada suspensão foram colocados em placas de cultura de células com 24 poços (poliestireno, TPP) e expostos à radiação solar por 1 h. As placas foram cobertas com filme de diacetato de celulose durante as exposições. Após as exposições, as suspensões foram agitadas e diluídas (10^{-1} a 10^{-2}) e 50 µL de cada diluição foram espalhados na superfície de 5 mL de meio PDAY, suplementado com 0,8 g L⁻¹ de ácido deoxicólico, 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 estendida 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 dos diferentes tratamentos foi estimado como descrito no item 3.5. Os resultados são mostrados como porcentagem de sobreviventes. Os conídios que não originaram colônias após 7 dias foram considerados mortos pelo tratamento. Os experimentos foram conduzidos entre as 11 e as 12 h dos dias 27, 28 e 29 de abril de 2015 em Ribeirão Preto, SP.

3.10. Análise Estatística

As comparações entre os diferentes tratamentos foram feitas por meio da análise de variância (ANOVA). Também foi utilizado o pós-teste de Tukey para as comparações múltiplas (MONTGOMERY, 2000). Os resultados foram obtidos com o auxílio do software SAS[®] 9.2, por meio da PROC GLM (The SAS system for Windows. Release 9.2. SAS Inst., Cary, NC. 2011).

4. RESULTADOS

I. Extração e identificação de cumarinas e furanocumarinas

4.1. Extração das cumarinas de óleos de limão Tahiti, toranja rubi e toranja branca

A partir de 50 mL do óleo essencial de limão Tahiti, 50 mL do óleo essencial de toranja rubi, 50 mL do óleo essencial de toranja branca e 50 mL do óleo da casca do limão Tahiti obtiveram-se massas de 23,11 g, 16,77 g, 11,89 g e 20 g, respectivamente, de extratos brutos. Foi obtido a partir de 100 ml de óleo da casca do limão Tahiti um segundo extrato bruto com massa de 79,37 g.

Também foi obtido um extrato bruto a partir do macerado de cascas de limão Tahiti em solvente hexano com massa de 0,1723 g. A separação das furanocumarinas e cumarinas presentes nos extratos brutos foi feita por meio da cromatografia líquida clássica (CLC) e cromatografia líquida a vácuo (CLV), usando-se sílica gel de tamanhos de poros diferentes para cada método cromatográfico, como fase estacionária e hexano/AcOEt, com gradiente de polaridade crescente, como fase móvel. Foram obtidas 13 frações do extrato bruto 1 (obtido do óleo da casca do limão Tahiti após partição com NH_4OH) e 13 do extrato bruto 4 (obtido do óleo essencial de toranja rubi). Todas as frações foram concentradas a vácuo e submetidas à CCDC.

As frações 2 e 5 (1,1441 g e 1,3158 g, respectivamente) obtidas na CLC do extrato bruto 1 apresentaram perfis cromatográficos característicos de cumarina e/ou furanocumarina. Portanto, essas frações foram submetidas à CLC flash, utilizando-se uma mistura de 80% de sílica 60 ($0,04 \times 0,063$ mm, 60 H, Merck, Alemanha) e 20% de sílica 60 ($0,060 \times 0,200$ mm, 60 A, Merck, Alemanha) e fase móvel hexano/AcOEt na proporção de 8:2 e 6:4, respectivamente. A partir da fração 2 foram obtidas 6 novas frações e, a partir da fração 5, foram obtidas 11 novas frações, às quais foram submetidas à CCDC para a verificação das cumarinas e/ou furanocumarinas presentes. As frações 2 e 3, obtidas da fração 2, e a fração 4, obtida da fração 5 da CLC do extrato bruto 1, foram analisadas por RMN ^1H para que sua estrutura fosse elucidada. Porém, devido às impurezas, não foi possível analisar os dados de RMN dessas frações.

A fração 6 do extrato bruto 1 e fração 7 do extrato bruto 4 foram submetidas à separação por CLAE e, posteriormente, denominadas Cl.6.p1, Cl.6.p2, Cpr.7.p1 e Cpr.7.p2. Todas as frações foram analisadas por métodos espectroscópicos (RMN ^1H e ^{13}C e HMQC), aliados a dados previamente descritos na literatura científica, e por CG-EM. Entretanto, as

frações Cl.6.p2 e Cpr.7.p2 não se encontravam com grau de pureza elevado; assim não foi possível obter sua elucidação estrutural.

A análise por CG-EM teve como objetivo identificar as substâncias majoritárias de acordo com o índice de similaridade expresso em porcentagem (maior que 80%), que é proposto pela biblioteca de padrões do equipamento utilizado.

Por meio do cromatograma dos íons totais (Figura 12) e do espectro de massas (Figura 13), foi possível identificar uma substância majoritária na fração Cl.6.p1, como descrito na Tabela 5.

Figura 12. Cromatograma obtido em CG-EM da substância 1 da fração Cl.6.p1

Tabela 5 – Composição química da substância da fração Cl.6.p1

Substância	Fórmula Molecular	M ⁺	t _R (min)	Área (%)
1	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	206	22,896	100

Figura 13. Espectro de massas (EM) obtido por CG-EM para a substância da fração Cl.6.p1 com $t_R = 22,896$ min e comparado com o EM contido na biblioteca de padrões

A substância 1 da fração Cl.6.p1 também foi submetida à análise de RMN de ^1H , a qual permite analisar o deslocamento químico (δ) dos hidrogênios presentes na substância e, juntamente com os dados obtidos dos mapas de contorno do HMQC, possibilitaram fazer atribuições dos carbonos ligados a hidrogênio confirmando a estrutura da molécula, como mostrado nas Figuras 14 a 21 e Tabela 6.

Figura 14. Sugestão para a estrutura química da substância 1 presente na fração Cl.6.p1

Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT obtidos pela análise do espectro da substância

1

Posição	δ_{H} (J= Hz)	δ_{H} (LEÃO et al., 2011)	* δ_{C}
1	-	-	-
2	-	-	161,9
3	6,2 (d, J= 9,6)	6,1 (d, J= 9,6)	111,2 e 111,4 (CH)
4	7,9 (d, J= 9,6)	8,0 (d, J= 9,6)	139,2 (CH)
4a	-	-	104,4
5	-	-	157,4
6	6,4 (d, J= 2,1)	6,4 (d, J= 2,1)	95,2 e 95,3 (CH)
7	-	-	164,11
8	6,3 (d, J= 2,1)	6,3 (d, J= 2,1)	93,1 e 93,2 (CH)
8a	-	-	157,2
OCH ₃	3,8	3,8	55,87 (CH ₃)
	3,9	3,9	55,95 (CH ₃)

*As multiplicidades dos carbonos foram atribuídas pelo DEPT.

O espectro (Tabela 6 e Figura 13) mostrou os hidrogênios do anel pirônico, em configuração Z, os quais foram identificados em δ 6,2 (d, J= 9,6, H-3) e δ 7,9 (d, J= 9,6, H-4). Identificaram-se também dois dubletos de hidrogênios do anel aromático, um em δ 6,3 (J= 2,1, H-8) e outro em δ 6,3 (J= 2,1, H-7), além de dois grupos metoxílicos ligados aos carbonos do anel aromático, um em δ 3,8 e outro em δ 3,9.

Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância 1 em CDCl_3

Figura 16. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) na região do deslocamento de 3.56-4.32 da substância 1 em CDCl_3

Figura 17. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) na região do deslocamento 5.78-6.68 da substância 1 em CDCl_3

Figura 18. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) na região do deslocamento 7.48-8.34 da substância **1** em CDCl_3

Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz) da substância 1 em CDCl_3

Figura 20. Espectro de DEPT (500 MHz) da substância 1 em CDCl_3

Figura 21. Espectro de HMQC (400 MHz) da substância 1 em CDCl_3

A substância presente na fração Cpr.7.p1 também foi analisada por RMN uni e bidimensional, além da análise em CG-EM. A análise em CG-EM evidenciou o tempo de retenção da substância presente nessa fração, massa molecular, fórmula molecular, porcentagem de área relativa e o íon molecular (Figuras 22 a 23 e Tabela 7).

Figura 22. Cromatograma obtido em CG-EM da fração Cpr.7.p1

Tabela 7 – Composição química da substância 2

Substância	Fórmula Molecular	M ⁺	t _R (min)	Área (%)
2	C ₉ H ₆ O ₃	162	21,558	98,55

Figura 23. Espectro de massas (EM) obtido por CG-EM para a substância da fração Cpr.7.p1 com $t_R = 21,571$ min e comparado com o EM contido na biblioteca de padrões

As análises de RMN uni e bidimensionais permitiram analisar o deslocamento químico (δ) dos hidrogênios presentes na substância e fazer atribuições dos carbonos ligados a hidrogênio. Sendo assim, as análises possibilitaram a atribuição dos carbonos quaternários e a confirmação da estrutura do composto, conforme Figuras 24 a 32 e Tabela 8.

Figura 24. Sugestão para a estrutura química da substância 2 presente na fração Cpr.7.p1

Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT obtidos pela análise do espectro da substância 2

Posição	δ_{H} (J= Hz)	δ_{H} (LEÃO et al., 2011)	* δ_{C}
1	-		-
2	-		163,75 (C)
3	6,2 (d, J= 9,5)	6,18 (d, J= 9,4)	112,36 (CH)
4	7,8 (d, J= 9,5)	7,74 (d, J= 9,6)	146,10 (CH)
4a	-	-	113,16 (C)
5	7,3 (d, J= 8,5)	7,45 (d, J= 8,5)	130,70 (CH)
6	6,8 (dd, J= 2,3 e J= 8,5)	6,79 (dd, J= 2,3 e J= 8,5)	114,57 (CH)
7	-	-	163,20 (C)
8	6,7 (d, J= 2,3)	6,71 (d, J= 2,2)	103,43 (CH)
8a	-	-	157,32 (C)
OH	5,0 (s)	-	-

*As multiplicidades dos carbonos foram atribuídas pelo DEPT.

O espectro (Tabela 8 e Figura 23) mostrou os hidrogênios do anel pirônico, os quais foram identificados em δ 6,2 (d, J= 9,5, H-3) e δ 7,8 (d, J= 9,5, H-4). Identificaram-se também dois dubletos de hidrogênios do anel aromático, um em δ 6,7 (J= 2,3, H-8) e outro em δ 7,3 (J= 8,5, H-5), e um duplo dubleto em δ 6,8 (J= 2,3 e J= 8,5, H-6), além de uma hidroxila ligada ao carbono do anel aromático em δ 5,0.

Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância **2** em CD_3OD

Figura 26. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) na região do deslocamento 4.44-5.28 da substância 2 em CD_3OD

Figura 27. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) na região do deslocamento 5.70-6.52 da substância 2 em CD_3OD

Figura 28. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) na região do deslocamento 6.28-7.10 da substância 2 em CD_3OD

Figura 29. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) na região do deslocamento 7.36-8.18 da substância 2 em CD_3OD

Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz), da substância 2 em CD_3OD

Figura 31. Espectro de DEPT da substância 2 em CD₃OD

Figura 32. Espectro de HMQC (400 MHz) da substância 2 em CD₃OD

4.1.2. Extratos Brutos

Todos os extratos brutos foram analisados por CG-EM. A partir das análises, pôde-se obter o cromatograma de íons totais. Os espectros de massas foram comparados com os obtidos das Bibliotecas Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 por meio do software GCMS Solution (Shimadzu, Japão), que forneceu o índice de similaridade (IS) expresso em porcentagem. Com o índice de similaridade e com os cálculos de Índice de Retenção Linear, que estão descritos no item 3.2 (VIEGAS; BASSOLI, 2007), foi possível obter a identificação dos constituintes químicos de cada extrato.

Figura 33. Cromatograma obtido em CG-EM do extrato bruto 1, que foi obtido do óleo da casca do limão Tahiti

Tabela 9 – Composição química do extrato bruto 1. *Índice de retenção linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade)

Pico	t _R (min)	Substância	Fórmula Molecular	Área (%)	Identificação
1	16,011	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆ O	8,30	EM e LRI
2	24,689	4-Terpinenol	C ₁₀ H ₁₈ O	3,63	EM e LRI
3	25,430	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	2,41	EM e LRI
4	33,724	Nerol-acetato	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	13,66	EM e LRI
5	34,583	7-Epi-sesquitujeno	C ₁₂ H ₂₄	3,97	EM e LRI
6	36,153	Geranil-acetato	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	2,98	EM *
7	36,805	Cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	13,86	EM e LRI
8	38,474	β -Bisaboleno	C ₁₅ H ₂₄	4,15	EM e LRI
9	39,830	Trans-3(10)caren-2-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	28,19	EM *
10	42,876	Óxido cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O	5,02	EM e LRI
11	43,793	(E)- β -Farneseno epóxido	C ₁₅ H ₂₄ O	3,86	EM e LRI
12	56,796	5,7-Dimetoxicumarina	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	9,98	EM e LRI

Figura 34. Cromatograma obtido em CG-EM do extrato bruto 2, que foi obtido do óleo essencial do limão Tahiti

Tabela 10 – Composição química do extrato bruto 2. *Índice de retenção linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade)

Pico	t _R (min)	Substância	Fórmula Molecular	Área (%)	Identificação
1	25,444	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	9,22	EM e LRI
2	25,804	γ -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	1,87	EM e LRI
3	31,115	1,8-Terpina	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	24,00	EM *
4	32,130	Cis-hidrato de terpina	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	10,11	EM *
5	36,579	Carvon hidrato	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	5,03	EM *
6	39,572	Limoneno-1,2-diol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	3,40	EM *
7	48,319	7-Metoxicumarina	C ₁₀ H ₈ O ₃	10,19	EM e LRI
8	56,819	5,7-Dimetoxicumarina	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	19,84	EM e LRI
9	59,219	Bergapteno	C ₁₂ H ₈ O ₄	8,83	EM e LRI
10	64,419	Isopimpinellina	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	7,51	EM e LRI

Figura 35. Cromatograma obtido em CG-EM do extrato bruto 3, que foi obtido do óleo das cascas de limão Tahiti maceradas em hexano

Tabela 11 – Composição química do extrato bruto 3. *Índice de retenção linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade)

Pico	t _R (min)	Substância	Fórmula Molecular	Área (%)	Identificação
1	48,452	7-Metoxicumarina	C ₁₀ H ₈ O ₃	8,19	EM *
2	56,814	5,7-Dimetoxicumarina	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	45,23	EM e LRI
3	59,234	Bergapteno	C ₁₂ H ₈ O ₄	22,83	EM e LRI
4	61,884	Etil linoleato	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	3,88	EM e LRI
5	62,093	Ácido linolênico	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	4,14	EM e LRI
6	64,444	Isopimpinlina	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	15,73	EM e LRI

Figura 36. Cromatograma obtido em CG-EM do extrato bruto 4, que foi obtido do óleo essencial de toranja rubi

Tabela 12 – Composição química do extrato bruto 4. *Índice de retenção linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade)

Pico	t _R (min)	Substância	Fórmula Molecular	Área (%)	Identificação
1	10,137	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	3,22	EM e LRI
2	10,742	γ-Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	0,54	EM e LRI
3	11,032	Trans-linanolol óxido	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	3,61	EM e LRI
4	11,329	Cis-linalool óxido	C ₁₀ H ₁₈ O	2,61	EM e LRI
5	13,167	Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0,75	EM *
6	13,690	7-Octeno-2,6-diol, 2,6-dimetil-	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1,37	EM *
7	14,390	2,6-Dimetil-1,7-octadieno-3,6-diol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	2,09	EM *
8	14,948	1,8-terpina	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	9,11	EM *
9	15,267	Cis-hidrato de terpina	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	2,81	EM *
10	15,437	4-Isopropenil-1-metil-1,2-ciclohexanodiol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	5,58	EM *
11	15,578	Álcool neril	C ₁₀ H ₁₈ O	0,43	EM *
12	15,601	Exo-2-hidroxicineol acetato	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	0,44	EM *
13	16,046	Álcool furfural	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	6,17	EM *
14	16,564	(1S,2S,3R,5S)-(+)-Pinanodiol	C ₁₉ H ₁₈ O ₂	2,84	EM *
15	16,682	E-Farneseno epóxido	C ₁₅ H ₂₄ O	3,90	EM *
16	17,581	β-bisaboleno	C ₁₅ H ₂₄	3,31	EM *
17	18,256	α-Metil-α-[4-metil-3-pentenil]oxiranometanol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	4,53	EM *
18	21,208	p-Metoxi-α-metil cinamaldeído	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	10,98	EM *
19	21,28	α-Elemol	C ₁₅ H ₂₆ O	0,84	EM *
20	21,729	7-Hidroxycumarina	C ₉ H ₆ O ₃	5,28	EM *

Continua

Continuação

21	22,888	5- α -Pregn-9(11)-en-12-ona	C ₂₁ H ₃₂ O	1,28	EM *
22	22,971	Guaiol	C ₁₅ H ₂₆ O	0,36	EM *
23	23,022	7-Hidroxi-6-metoxi-4-metil-cumarina	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	0,50	EM *
24	23,422	2,5-Di-t-amil- <i>p</i> -benzoquinona	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	2,99	EM *
25	25,288	7-Metoxi-8-(2-oxo-3-metilbutil)cumarina	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	10,82	EM *
26	25,989	2-[2-(4-Metoxifenil)vinil]-3,3-dimetil-3H-indol	C ₁₉ H ₁₉ NO	11,89	EM *
27	27,072	Deoxinivalenol	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	1,77	EM *

Figura 37. Cromatograma obtido em CG-EM do extrato bruto 5, que foi obtido do óleo essencial de toranja branca

Tabela 13 – Composição química do extrato bruto 5. *Índice de retenção linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade)

Pico	t _R (min)	Substância	Fórmula Molecular	Área (%)	Identificação
1	22,040	Ciclo-octanona	C ₈ H ₁₄ O	4,9	EM *
2	32,073	3,6-Dimetil-2-octanona	C ₁₀ H ₂₀ O	2,93	EM *
3	32,780	Limoneno glicol	C ₁₀ H ₁₈ O	7,1	EM e LRI
4	39,102	Citronelal	C ₁₀ H ₁₈ O	1,85	EM e LRI
5	39,348	Tetradecametil- cicloheptasiloxano	C ₁₄ H ₄₂ O ₇ Si 7	2,14	EM *
6	39,597	4-Isopropenil-1-metil- 1,2-ciclohexanodiol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	1,7	EM *
7	45,789	Hexadecametil- ciclooctasiloxano	C ₁₆ H ₄₈ O ₈ Si 8	2,4	EM *
8	48,487	1-Hidroximetil-7,7- dimetilbiciclo[2.2.1]hept an-2-ona	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	14,18	EM *
9	49,230	Biciclo[2.2.1]heptan-2- ol, 2-alil-1,7,7-trimetil- 1,1,1,5,7,7,7-	C ₁₃ H ₂₂ O	3,14	EM *
10	511,36 0	Heptametil-3,3- bis(trimetilsiloxi)tetrasil oxano 4-[3,4-	C ₁₃ H ₄₀ O ₅	3,36	EM *
11	61,267	Dimetoxiciclohexil]-n- butanol	C ₁₂ H ₂₄ O ₃	4,74	EM *
12	61,006	[(2-fluorofenil)metil]- 1H-Purin-6-amina	C ₁₂ H ₁₀ FN ₅	1,08	EM *
13	65,949	1,6,10,14,18,22- Tetracosahexaen-3-ol, 2,6,10,15,19,23- hexametil-, (E)-	C ₃₀ H ₅₀ O	11,56	EM *

Continua

Continuação

14	68,830	Ferro, monocarbonil- (1,3-butadieno-1,4- dicarbônico ácido, dietil éster) a,a'-dipiridil	$C_{21}H_{22}FeN_2O_5$	1,15	EM *
15	70,353	1-Ciclohexanona, 5-(2- {[1-(1,1-dimetiletil)-1,1- dimetilsilil]oxi}-1- metiletil)-2-metil	$C_{16}H_{32}O_2Si$	4,38	EM *
16	72,729	Óleo de silicone	NI	1,2	EM *
17	75,496	9-(3,3-Dimetiloxiran-2- il)-2,7-dimetilnona-2,6- dien-1-ol	$C_{15}H_{26}O_2$	22,35	EM *
18	77,485	6-Etoxi-6-metil-2- ciclohexenona	$C_9H_{14}O_2$	9,83	EM *

II - Fotoinativação de conídios de *Colletotrichum acutatum*

4.2. Avaliação do efeito do tratamento fotodinâmico com azul de metileno e radiação solar na sobrevivência dos conídios

O efeito do TFA com o MB e radiação solar na sobrevivência de conídios de *C. acutatum* foi avaliado conforme descrito no item 3.5. Os conídios foram pré-incubados por 30 min, com o MB (50 µM) e expostos à radiação solar por 30 min, 1 e 2 h, entre às 11 e 13 h dos dias 16 e 17 de junho e do dia 14 de julho de 2014, em Ribeirão Preto, SP. A fração de sobreviventes (sobrevivência relativa) após o TFA foi calculada em relação aos controles expostos apenas à luz.

As irradiâncias espectrais solares no UV (280 a 400 nm) e no visível (400 a 700 nm), registradas às 12 h do dia 19 de agosto de 2014 são mostradas na Figura 38 A e B, respectivamente.

Figura 38. Irradiância espectral solar no UV (280 a 400 nm) (A) e no visível (400 a 700 nm) (B) do dia 19 de agosto de 2014 as 12 h

Efeito das exposições apenas à radiação solar ou do tratamento apenas com o fotossensibilizador. Exposições à radiação solar por apenas 30 min não mataram os conídios ($P > 0,05$ para todas as comparações). Exposições à radiação solar por 1 h mataram entre 4,446% (dia 16 de junho) e 12,340% (dia 14 de julho) dos conídios ($P > 0,05$ para todas as comparações). Exposições à radiação solar por 2 h mataram entre 6,023% (dia 14 de julho) e 9,396% (dia 16 de junho) dos conídios ($P > 0,05$ para todas as comparações, exceto dia 16 de junho).

O tratamento com o MB na ausência de luz não matou os conídios ($P > 0,05$ para todas as comparações) (Apêndices F a I).

Efeito do tratamento fotodinâmico. O efeito do TFA com MB é mostrado na Figura 39. O TFA com MB por 30 min matou entre 98,398% (dia 14 de julho) e 99,932% (dia 16 de junho) dos conídios, (redução de até 3 ordens de grandeza) ($P < 0,05$ para todas as comparações). O TFA com MB por 1 h matou entre 99,998% (dia 14 de julho) e 99,999% (dia 16 de junho) dos conídios (redução de até 5 ordens de grandeza nos dias 14 de julho e 16 de junho) ($P < 0,05$). O TFA com MB por 1 h matou 100% dos conídios no dia 17 de junho de 2014 ($P < 0,05$). O TFA com MB por 2 h matou 100% dos conídios, nos dias 17 de junho e 14 de julho de 2014 ($P < 0,05$) e matou 99,997% dos conídios no dia 16 de junho (redução de 4 ordens de grandeza) ($P < 0,05$).

Figura 39. Efeito do tratamento fotodinâmico com azul de metileno e radiação solar na sobrevivência dos conídios de *C. acutatum*. Os conídios foram incubados com o FS por 30 min e, a seguir, expostos à radiação solar por 30 min, 1 e 2 h. As barras de erros indicam o desvio padrão. Os experimentos foram realizados nos dias 16 e 17 de junho e 14 de julho de 2014. *Não foram observados sobreviventes

4.3. Avaliação do efeito do tratamento com furanocumarinas e cumarinas e radiação solar na sobrevivência dos conídios

Os efeitos dos tratamentos com as furanocumarinas e cumarinas e radiação solar na sobrevivência de conídios de *C. acutatum* foram avaliados conforme descrito no item 3.6. Os conídios foram pré-incubados com os compostos puros (50 μM) e com as misturas (12,5 mg L^{-1}) por 30 min e expostos à radiação solar por 1 h. Todos os experimentos foram conduzidos entre 11 e 12 h, em Ribeirão Preto, SP. Os extratos brutos foram avaliados nos dias 8, 9 e 10 de setembro de 2014, as frações isoladas nos 14, 15 e 29 de outubro de 2014 e o 8-MOP e a cumariana foram avaliados todos os dias.

As irradiâncias espectrais solares no UV (280 a 400 nm), registradas às 12 h dos dias 2 e 17 de setembro e 22 de outubro de 2014, são mostradas na Figura 40.

Figura 40. Irradiância espectral solar no UV (280 a 400 nm) obtida às 12 h nos dias 02 e 17 de setembro e no dia 22 de outubro de 2014

Efeito das exposições apenas à radiação solar ou do tratamento apenas com os compostos. Exposições à radiação solar por 1 h, nos dias 08, 09 e 10 de setembro, mataram entre 11,366% (dia 10 de setembro) e 16,471% (dia 08 de setembro) dos conídios ($P < 0,05$ para todas as comparações, exceto no dia 10 de setembro). Exposições à radiação solar por 1 h, nos dias 14, 15 e 29 de outubro, mataram entre 16,062% (dia 29 de outubro) e 29,639% (dia 14 de outubro) dos conídios ($P > 0,05$ para todas as comparações, exceto no dia 14 de outubro) (Figuras 41 e 42).

Os tratamentos com 8-MOP, na ausência de luz, nos dias 08, 09 e 10 de setembro, mataram em média 11,733% ($P < 0,05$ para todas as comparações). Os tratamentos com 8-MOP, na ausência de luz, nos dias 14, 15 e 29 de outubro, mataram em média 5,312% dos conídios ($P > 0,05$ para todas as comparações). Os tratamentos com cumarina, na ausência de luz, nos dias 08, 09 e 10 de setembro, mataram em média 13,683% ($P > 0,05$ para todas as comparações, exceto dia 08 de setembro). Os tratamentos com cumarina, na ausência de luz, nos dias 14, 15 e 29 de outubro, mataram em média 3,111% dos conídios, respectivamente ($P > 0,05$ para todas as comparações). Os tratamentos com 5,7-dimetoxicumarina, 7-hidroxycumarina, mistura de cumarinas e isopimpinellina, na ausência de luz, mataram em média 10,651%, 4,874%, 8,393% e 4,069% dos conídios, respectivamente ($P > 0,05$ para todas as comparações). Os tratamentos com os extratos brutos 1, 2, 3, 4 e 5, na ausência de luz, mataram em média 6,611%, 9,871%, 5,654%, 10,772% e 4,518% dos conídios, respectivamente ($P > 0,05$ para todas as comparações, exceto no dia 8 de setembro) (Apêndices J a O).

Efeito das exposições simultâneas à radiação solar e aos compostos. Os efeitos dos tratamentos simultâneos com a radiação solar e com os diferentes compostos na sobrevivência dos conídios de *C. acutatum* são mostrados nas Figuras 41 e 42. O fototratamento com 8-MOP matou 100% dos conídios nos experimentos realizados nos dias 08 e 10 de setembro e 15 e 29 de outubro de 2014 ($P < 0,05$). Nos dias 09 de setembro e 14 de outubro o tratamento com 8-MOP matou 99,999% e 99,378% dos conídios, respectivamente ($P < 0,05$). O fototratamento com a cumarina, nos dias 08, 09 e 10 de setembro, matou entre 34,417% (dia 10 de setembro) e 42,248% (dia 9 de setembro) dos conídios ($P < 0,05$ para todas as comparações). Nos dias 14, 15 e 29 de outubro, o fototratamento com a cumarina matou entre 15,749% (dia 29 de outubro) e 25,885% (dia 14 de outubro) dos conídios ($P > 0,05$ para todas as comparações, exceto dia 14 de outubro). O fototratamento com 5,7-dimetoxicumarina matou entre 5,080% (dia 29 de outubro) e 15,835% (dia 15 de outubro) e o fototratamento com 7-hidroxycumarina matou entre 2,493% (dia 15 de outubro) e 11,965% (dia 14 de outubro) dos conídios ($P > 0,05$ para todas as comparações). O fototratamento com a mistura de cumarinas foi muito eficiente, matando entre 99,336% e 99,669% dos conídios ($P < 0,05$ para todas as comparações). O fototratamento com a isopimpinellina matou entre 48,473% (dia 14 de outubro) e 79,508% (dia 29 de outubro) dos conídios ($P < 0,05$ para todas as comparações).

Os fototratamento com os extratos brutos mataram os conídios de *C. acutatum* ($P < 0,05$). Dentre os extratos brutos, o que mostrou a maior atividade fotossensibilizadora foi o extrato bruto 3 (obtido das cascas de limões Tahiti maceradas em hexano), que matou entre 65,049% (dia 09 de setembro) e 68,319% (dia 08 de setembro) dos conídios ($P < 0,05$ para todas as comparações). Os fototratamentos com os demais extratos foram menos eficientes, matando entre 21,305 e 59,217% dos conídios de *C. acutatum* ($P < 0,05$, para todas as comparações).

Figura 41. Sobrevivência relativa dos conídios de *C. acutatum* após o tratamento com os diferentes compostos e radiação solar. Os conídios foram incubados com os compostos por 30 min e, a seguir, expostos à radiação solar por 1 h. As barras de erros indicam o desvio padrão. Os experimentos foram realizados nos dias 14, 15 e 29 de outubro de 2014. *Não foram observados sobreviventes

Figura 42. Sobrevivência relativa dos conídios de *C. acutatum* após o tratamento com os diferentes compostos e radiação solar. Os conídios foram incubados com os compostos por 30 min e, a seguir, expostos à radiação solar por 1 h. As barras de erros indicam o desvio padrão. Os experimentos foram realizados nos dias 08, 09 e 10 de setembro de 2014. *Não foram observados sobreviventes

4.4. Efeito do tratamento com os diferentes fotossensibilizadores nas folhas adultas de mudas de laranja Valencia (*Citrus sinensis*)

A Figura 43 mostra uma das folhas de laranja Valencia após a aplicação dos compostos. Como descrito no item 3.7, os compostos foram aplicados na superfície superior das folhas e reaplicados a cada 3 dias, durante 21 dias. Durante todo o período, as plantas foram mantidas ao ar livre, expostas à radiação solar. As plantas foram avaliadas visualmente (a olho nu) para verificar a ocorrência de danos durante o transcorrer do experimento. As avaliações foram feitas em três folhas por planta, em três plantas diferentes. O experimento foi realizado entre os dias 14 de novembro e 05 dezembro de 2014. Como mostrado na Figura 43, nenhuma lesão ou alteração morfológica foi observada.

Figura 43. Efeito da exposição simultânea à radiação solar e aos compostos nas folhas de laranja Valencia (*Citrus sinensis*). Antes da aplicação dos FS (A), após a aplicação do 8-MOP, extrato bruto 1 (EB1), extrato bruto 3 (EB3), 5,7-dimetoxicumarina (Fr1) e mistura de cumarinas (cumarinas) (B), 2 h depois da aplicação (C), 72 h após a primeira aplicação (D), uma semana após a primeira aplicação (E), três semanas após a primeira aplicação (F)

4.5. Avaliação do efeito da exposição à radiação solar nos espectros de absorção e emissão de fluorescência do 8-metoxipsoraleno

A exposição do FS a altas irradiâncias pode alterar a estrutura da molécula o que, consequentemente, poderá alterar seu espectro de absorção e emissão. Como descrito

anteriormente no item 3.8, o efeito da exposição à radiação solar nos espectros de absorção e emissão de fluorescência do FS 8-MOP foi avaliado.

Soluções de 8-MOP (50 μ M) foram expostas à radiação solar por 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas, em placas de Petri descartáveis (60 $\times$ 15 mm) (poliestireno, J. Prolab), cujas tampas foram substituídas por filmes de triacetato de celulose com 0,13 mm de espessura (*0.13-mm-thick premium cellulose triacetate*; Liard Plastics, Salt Lake City, EUA, UT). As placas foram expostas à radiação solar nos dias 24 de março e 17 de abril de 2015, das 6 às 18 h. Em ambos os dias, o céu estava claro, sem nebulosidade. Uma alíquota de 1 mL das soluções foi utilizada para a obtenção dos espectros de absorção e de emissão de fluorescência, como descrito anteriormente no item 3.3. Em ambos os dias também foram feitas exposições à radiação solar de 30 min, 1 e 2 h de duração, a partir das 11 h.

Os espectros de absorção após exposição à radiação solar por até 12 h são mostrados na Figura 44.

Figura 44. Espectros de absorção no UV do 8-MOP na concentração de 50 μM não exposto à radiação solar, após 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h de exposição. As exposições foram feitas das 6 às 18 h, nos dias 24 de março e 17 de abril de 2015. No segundo gráfico, o espectro correspondente a 2 h está sobrepondo o espectro correspondente a 1 h

Os espectros de emissão de fluorescência após exposição à radiação solar por 0 a 12 h são mostrados na Figura 45.

Figura 45. Espectro de emissão de fluorescência do 8-MOP na concentração de 50 µM não exposto à radiação solar, após 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h de exposição. As exposições foram feitas das 6 às 18 h dos dias 24 de março e 17 de abril de 2015

Os espectros de absorção após exposição à radiação solar por 0 a 2 h, das 11 as 13 h, são mostrados na Figura 46.

Figura 46. Espectro de absorção no UV do 8-MOP na concentração de 50 μM não exposto à radiação solar, após 30 min, 1 e 2 h de exposição. As exposições foram feitas das 11 às 13 h, no dia 24 de março de 2015

Os espectros de emissão de fluorescência após exposição à radiação solar por 0 a 2 h, das 11 às 13 h, são mostrados na Figura 47.

Figura 47. Espectro de emissão de fluorescência do 8-MOP na concentração de 50 μM não exposto à radiação solar, após 30 min, 1 e 2 h de exposição. As exposições foram feitas das 11 às 13 h, nos dias 24 de março e 17 de abril de 2015

4.4. Avaliação da eficácia do 8-metoxipsoraleno no TFA após sua prévia exposição à radiação solar

A exposição de FS a altas irradiâncias pode reduzir a sua atividade. Foram avaliados os efeitos da exposição à radiação solar na atividade fotossensibilizadora do 8-MOP e a eficácia em fotoinativar os conídios de *C. acutatum*, como descrito anteriormente no item 3.9. Os conídios foram incubados por 30 min com o 8-MOP (50 μM) não exposto à radiação e previamente exposto à radiação solar por 6 e por 12 h. Os experimentos foram conduzidos nos dias 27, 28 e 29 de abril de 2015 em Ribeirão Preto, no período das 11 às 12 h de cada dia.

As irradiâncias espectrais solares no UV (280 a 390 nm), registradas as 12 h dos dias 23 e 30 de abril de 2015 são mostradas na Figura 48.

Figura 48. Irradiância espectral solar no UV (280 a 400 nm) dos dias 23 e 30 de abril de 2015 as 12 h

Efeito das exposições apenas à radiação solar ou apenas ao fotossensibilizador.

Exposições por 1 h à radiação solar mataram entre 2,344% (dia 27 de abril) e 6,375% (dia 28 de abril) dos conídios (Figura 49). Tratamentos apenas com 8-MOP não exposto previamente à radiação solar mataram entre 7,031% (dia 29 de abril) e 15,863% (dia 28 de abril) dos conídios. Tratamentos com 8-MOP exposto previamente à radiação solar por 6 h mataram entre 9,077% (dia 27 de abril) e 14,029% (dia 29 de abril) dos conídios. Tratamentos com 8-MOP exposto previamente à radiação solar por 12 h mataram entre 9,823% (dia 28 de abril) e 14,232% (dia 29 de abril) dos conídios.

Efeito das exposições simultâneas à radiação solar e ao fotossensibilizador. Os efeitos do TFA com 8-MOP não exposto à radiação solar e exposto previamente à radiação solar por 6 e por 12 h na sobrevivência dos conídios de *C. acutatum* são mostrados na Figura 49. O TFA com 8-MOP não exposto previamente à radiação solar matou entre 99,998% (dia 28 de abril) e 99,999% (dia 27 de abril) dos conídios. No dia 29 de abril, o TFA com 8-MOP não exposto previamente à radiação solar matou 100% dos conídios de *C. acutatum*. O TFA com o 8-MOP exposto previamente à radiação solar por 6 h matou entre 99,978% (dia 29 de abril) e 99,992% (dia 28 de abril) dos conídios. O TFA com o 8-MOP exposto previamente à radiação solar por 12 h matou entre 95,591% (dia 27 de abril) e 98,540% (dia 28 de abril) dos conídios.

Figura 49. Sobrevivência dos conídios de *C. acutatum* após o TFA com 8-MOP não exposto, exposto previamente à radiação solar por 6 h e exposto previamente à radiação solar por 12 h. Os conídios foram incubados com as soluções de 8-MOP por 30 min e expostos à radiação solar por 1 h. As barras de erros indicam o desvio padrão. Os experimentos foram realizados nos dias 27, 28 e 29 de abril de 2015. *Não foram observados sobreviventes

5. DISCUSSÃO

I. Extração e identificação de cumarinas e furanocumarinas de espécies de *Citrus*

A necessidade de superar os problemas do controle de fungos fitopatogênicos baseado no uso de fungicidas convencionais tem estimulado o desenvolvimento de abordagens alternativas, como o TFA. Entretanto, o TFA para o controle de patógenos de plantas no campo será aplicado em condições muito diferentes das utilizadas na clínica médica. Por exemplo, o controle de fitopatógenos no pré-colheita requererá a aplicação do FS em grandes áreas e, para isso, será necessário o uso de FS baratos e que não provoquem danos ao meio ambiente. Deste modo, é desejável o desenvolvimento de processos para sintetizar FS em grande quantidade e a baixo custo (De MENEZES, 2014a). De maneira alternativa, FS também podem ser obtidos diretamente de plantas ou de resíduos gerados durante o processamento de frutas, como o limão Tahiti ou as toranjas, que contêm cumarinas e furanocumarinas (De MENEZES, 2014a,b).

Diversas famílias de plantas, incluindo-se a Rutaceae, produzem FS naturais, como as cumarinas e as furanocumarinas (HUDSON; TOWERS 1991; ASTHANA et al., 1993). As plantas produzem esses metabólitos que atuam como protetores contra microrganismos e insetos, tanto por meio de mecanismos dependentes como independentes da luz (BINTSIS et al., 2000; BOGUCKA-KOCKA; KRZACZEK, 2003). Nos frutos das espécies do gênero *Citrus*, as furanocumarinas estão geralmente localizadas nas glândulas de óleo da casca (FISHER; TRAMA, 1979).

Cumarinas e furanocumarinas podem ser obtidas a partir de produtos (óleo da casca e essenciais), subprodutos (bagaço com casca e bagacilho) e resíduos industriais (água da saída da concentradora, água da descarga da polidora, bagaço com casca e bagacilho) do processamento industrial do limão Tahiti e das toranjas. De Menezes e colaboradores (2014a) isolaram uma mistura de duas cumarinas e uma furanocumarina da água da saída da concentradora, obtida durante o processamento do limão Tahiti. A atividade fotossensibilizadora desses compostos em conídios de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *A. nidulans* foi demonstrada.

No presente estudo, foram extraídas e caracterizadas cumarinas e furanocumarinas presentes nos óleos essenciais e nos óleos da casca do limão Tahiti e das toranjas rubi e branca. A partir de 61,5 g do extrato bruto 1 (obtido do óleo da casca do limão Tahiti) e de 16,77 g do extrato bruto 4 (obtido do óleo essencial de toranja rubi), foram obtidas frações

com 0,9753 g e 0,3442 g, respectivamente. Essas frações foram submetidas à análise e separação por CLAE e, posteriormente, análise por RMN uni e bidimensional e CG-EM. As frações foram, então, identificadas duas cumarinas com grau de pureza superior a 90%: a 5,7-dimetoxicumarina, com massa de 0,0131 g e a 7-hidroxycumarina, com massa de 0,0140 g.

Além das substâncias isoladas, os cinco extratos brutos obtidos a partir dos óleos da casca e dos óleos essenciais do limão Tahiti e das toranjas rubi e branca foram analisados por CG-EM. Os dados obtidos nas análises de CG-EM dos extratos brutos foram comparados com os índices de similaridade expressos em porcentagem pela biblioteca de padrões do equipamento. Além disso, foram feitos cálculos de índice de retenção linear (LRI) e esses índices foram comparados com dados previamente descritos na literatura, e assim foi possível determinar os componentes de cada extrato. Todos os extratos, com exceção do extrato bruto 5 (obtido do óleo essencial da toranja branca), apresentaram cumarinas e/ou furanocumarinas em sua composição.

No extrato bruto 1, obtido do óleo da casca do limão Tahiti, a única cumarina encontrada foi a 5,7-dimetoxicumarina (9,98%), que foi isolada a partir desse extrato. No extrato bruto 2, obtido do óleo essencial de limão Tahiti, foi constatada a presença da 5,7-dimetoxicumarina (19,84%), 7-metoxicumarina (10,19%), além das furanocumarinas, isopimpinellina (7,51%) e bergapteno (7H-Furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona, 4-metoxi-) (8,83%). O extrato bruto 3, obtido do óleo das cascas de limão Tahiti maceradas em hexano, foi o que apresentou maior quantidade de cumarinas e/ou furanocumarinas em relação aos demais constituintes. Entre as 6 substâncias presentes nesse extrato, 4 delas eram cumarinas e furanocumarinas, tais como a 5,7-dimetoxicumarina (45,23%), a 7-metoxicumarina (8,19%), bergapteno (22,83%) e isopimpinellina (15,73%). No extrato bruto 4, obtido do óleo essencial de toranja rubi, foram encontradas as cumarinas 7-hidroxycumarina (5,28%), que foi isolada a partir desse extrato, a 7-hidroxi-6-metoxi-4-metil-cumarina (0,50%) e a 7-metoxi-8-(2-oxo-3-metilbutil)cumarina (10,82%). Na maioria dos extratos foram encontradas outras substâncias que estão comumente presentes em óleos essenciais de limão Tahiti ou toranjas, como, por exemplo, limoneno, linalool, α e γ -terpineol, α e β -bisaboleno e γ -terpineno (SHAW, 1979; TAO; LIU; ZHANG, 2009). O extrato bruto 3, proveniente da maceração de cascas de limão Tahiti em hexano, foi o extrato que forneceu a maior quantidade de cumarinas e/ou furanocumarinas e, portanto, foi considerado a melhor fonte para a obtenção dessas substâncias.

A aplicação de FS no ambiente e em larga escala requer o uso de FS seguros para o ser humano e meio ambiente. As cumarinas e furanocumarinas são compostos produzidos naturalmente por plantas, incluindo-se as espécies de *Citrus* nas quais essas substâncias seriam aplicadas como FS para o controle de fitopatógenos (De MENEZES et al., 2014a). Isso provavelmente facilitará o licenciamento de fungicidas baseados nesses compostos.

A constatação da eficácia e ausência de danos no hospedeiro vegetal decorrentes do uso de cumarinas e/ou furanocumarinas para a fotoinativação de fitopatógenos viabiliza a continuidade dessa linha de pesquisa. Adicionalmente, o fato de essas substâncias poderem ser obtidas de resíduos, sem valor comercial, da indústria citrícola poderá tornar a sua produção economicamente factível.

II. Inativação Fotodinâmica de Conídios

Embora promissor, o TFA para o controle de fungos fitopatogênicos encontra-se em fase inicial de desenvolvimento (De MENEZES et al., 2014a,b). A maior parte dos experimentos foi conduzida *in vitro*, utilizando-se tanto FS de ocorrência natural, como tiofenos, cumarinas e furanocumarinas (DiCOSMO et al., 1982; De MENEZES et al., 2014a,b; ASTHANA et al., 1993), como sintéticos, como os corantes fenotiazínicos (De MENEZES et al., 2014a,b). Além disso, poucos trabalhos avaliaram os efeitos do TFA na planta hospedeira (De MENEZES et al., 2014a,b).

Trabalhos anteriores mostraram que o TFA com FS fenotiazínicos, como o MB, TBO, novo azul de mentileno (NMBN) e S137, são muito efetivos em conídios de diversas espécies de fungos filamentosos. Gonzales e colaboradores (2010) avaliaram o efeito do TFA com os FS MB e TBO na sobrevivência de conídios de *Aspergillus nidulans* e do fungo entomopatogênico e bioinseticida *Metarhizium robertsii*. Os conídios foram tratados com diferentes concentrações dos FS e expostos à luz visível por 30 e 60 min. O TFA resultou na morte de até 99,7% dos conídios das duas espécies. O TFA também atrasou a germinação dos conídios sobreviventes. De Menezes e colaboradores (2014b) avaliaram o efeito do TFA *in vitro* com dois FS fenotiazínicos, NMBN e S137, na sobrevivência de conídios de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *A. nidulans*. A excitação dos FS foi feita tanto pela luz vermelha emitida por LEDs como pela radiação solar natural. O TFA com os dois FS, tanto com luz vermelha como com a radiação solar, foi muito eficaz contra os conídios das três espécies de fungos. O tratamento com NMBN (50 μM e fluência de 15 J cm^{-2}) reduziu a sobrevivência dos conídios de todas as espécies em aproximadamente

5 ordens de grandeza. O TFA com o S137 foi ainda mais eficiente para matar os conídios, já que a concentração de 10 μM e dose de 15 J cm^{-2} causaram a mesma redução da sobrevivência. Os efeitos do TFA com quatro FS fenotiazínicos (NMBN, S137, MB e TBO) nas folhas de *Citrus sinensis* também foram avaliados. Nenhum dano foi observado nas folhas. Segundo os autores, um dos fatores que podem explicar a ausência de danos é o fato de os fotossensibilizadores não terem atravessado a cutícula das folhas. Como as espécies reativas de oxigênio produzidas durante o TFA têm uma meia vida muito pequena, a sua difusão é limitada e, conseqüentemente, os danos provocados por elas, estão restritos às estruturas que estão próximas do FS. Como os FS permanecem do lado de fora da cutícula, que tem aproximadamente 4 μm de espessura, as estruturas internas da folha não são danificadas pelo TFA.

No presente estudo foi demonstrado que o TFA com o fenotiazínico mais barato encontrado no mercado, o MB, é extremamente eficaz contra os conídios de *C. acutatum*, podendo inativar 100% dos conídios após uma hora de exposição à radiação solar. O preço por hectare tratado com MB é cerca de 1/3 do preço do tratamento com os fungicidas convencionais atualmente utilizados, o que torna o TFA extremamente interessante do ponto de vista econômico.

O efeito deletério do fototratamento com diferentes classes de FS extraídos de plantas foi demonstrado em diversas espécies de fungos. DiCosmo e colaboradores (1982) reportaram os efeitos do TFA *in vitro* em conídios dos fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium variable*, *Colletotrichum* spp., *Rhizopus nigricans*, *Pythium aphanidermatum* e *Saprolegnia* spp., utilizando FS de ocorrência natural, como os derivados de tiofenos. Recentemente, De Menezes e colaboradores (2014a) avaliaram a eficácia do TFA com radiação solar e uma furanocumarina comercial (8-MOP), uma furanocumarina (isopimpinellina) e uma mistura 3:1 das cumarinas 7-metoxicumarina e 5,7-dimetoxicumarina na sobrevivência dos conídios de *C. acutatum* e *A. nidulans*. A isopimpinellina e a mistura de cumarinas foram extraídas de um resíduo produzido durante o processamento industrial do limão Tahiti. O fototratamento com 8-MOP e com a mistura de cumarinas resultou em reduções na sobrevivência de pelo menos 4 ordens de grandeza. O efeito do TFA com a isopimpinellina foi menor. O efeito dos TFA com os compostos nas folhas de laranjeira (*Citrus sinensis*) também foram avaliados. Os FS foram reaplicados diversas vezes nas folhas de plantas expostas à radiação solar e nenhum dano foi observado.

Um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar a eficácia, *in vitro*, do TFA com cumarinas e furanocumarinas extraídas do limão Tahiti e de toranjas. Foram avaliadas as atividades fotossensibilizadoras, não apenas de compostos puros, mas também de misturas e de diversos extratos brutos obtidos durante as extrações. Como controles positivos, foram testadas a furanocumarina comercial 8-MOP e uma mistura 3:1 das cumarinas 7-metoxicumarina e 5,7-dimetoxicumarina. A mistura foi obtida em um estudo anterior conduzido pelo nosso grupo (De MENEZES et al., 2014a). O 8-MOP e a mistura de cumarinas foram escolhidos porque experimentos anteriores mostraram que ambas são muito eficazes na fotoinativação de conídios (De MENEZES et al., 2014a). No presente estudo, o 8-MOP e a mistura de cumarinas foram os compostos que mostraram a maior atividade fotossensibilizadora sobre os conídios de *Colletotrichum*. O TFA com o 8-MOP (50 μ M) e uma hora de exposição matou 100% dos conídios e o tratamento com a mistura de cumarinas matou pelo menos 99% dos conídios. Nenhum dos compostos puros, misturas e extratos avaliados mostrou a mesma eficácia. O TFA com 5,7-dimetoxicumarina pura (que é um dos componentes da mistura de cumarinas) teve um efeito pequeno na sobrevivência dos conídios. Isso indica que a atividade fotossensibilizadora está sendo exercida pela 7-metoxicumarina, que é o componente majoritário da mistura. Entretanto, a existência de um efeito sinérgico entre as duas cumarinas não pode ser descartada. O TFA com a 7-hidroxycumarina, que foi a outra cumarina isolada no presente estudo, também mostrou pouco efeito na sobrevivência dos conídios. O TFA com a furanocumarina isopimpinellina inativou pelo menos 50% dos conídios, confirmando resultados anteriores (De MENEZES et al., 2014a).

Dentre os extratos brutos testados, o extrato bruto 3 (obtido do óleo de cascas de limões Tahiti maceradas em hexano) foi o que apresentou maior atividade, inativando pelo menos 70% dos conídios. Isso pode ser atribuída à maior quantidade de cumarinas e furanocumarinas presentes nesse extrato.

De maneira geral, o tratamento apenas com os compostos, no escuro, teve um efeito pequeno na sobrevivência dos conídios. Exposições apenas à radiação solar por 1 h mataram até 30% dos conídios. Está bem estabelecido que exposições à radiação solar, particularmente à radiação UVA e UVB, são deletérias aos conídios (BRAGA et al., 2015). Conídios de *Colletotrichum* são mortos após poucas horas de exposição direta à radiação solar (De MENEZES et al., 2014a).

Em condições de campo, o microrganismo e o hospedeiro vegetal serão expostos à radiação solar e ao FS simultaneamente, portanto é necessário avaliar a toxicidade dos possíveis fotossensibilizadores ao hospedeiro. Os diferentes compostos foram aplicados repetidamente em folhas adultas de mudas de laranja Valencia. A avaliação foi feita durante 21 dias e as plantas foram mantidas em regime normal de luz. Nenhum dano foi observado.

Exposições a altas irradiâncias nas faixas do visível ou UV, como as presentes na radiação solar, podem alterar a estrutura química do FS e, conseqüentemente, reduzir sua atividade fotossensibilizadora. Com o objetivo de avaliar a estabilidade química e a manutenção da atividade fotossensibilizadora do 8-MOP, nós expusemos esse FS à radiação solar antes de utilizá-lo no TFA de conídios de *Colletotrichum*. O FS foi exposto à radiação solar por até 12 h em dias sem nebulosidade. As exposições à radiação alteraram os espectros de absorção e de emissão de fluorescência do 8-MOP. Apesar dessas alterações, o TFA com o FS previamente exposto à radiação solar continuou muito eficaz contra os conídios. O TFA com 8-MOP previamente exposto à radiação solar por 6 e por 12 h matou em média 99 e 97% dos conídios, respectivamente. Esse resultado indica que o FS continuará ativo, por pelo menos dois dias, após a aplicação no campo.

6. CONCLUSÕES

É possível extrair cumarinas e furanocumarinas tanto de produtos (óleos) como de subprodutos do processamento do limão Tahiti e das toranjas e utilizá-las para fotoinativar conídios do fungo fitopatogênico *Colletotrichum acutatum*.

O tratamento simultâneo com a furanocumarina 8-MOP e radiação solar provoca a inativação completa dos conídios do fungo do mesmo modo que o fototratamento com o corante fenotiazínico azul de metileno.

A exposição à radiação solar altera os espectros de absorção e de emissão de fluorescência do 8-MOP; entretanto, essas alterações não impedem que o composto continue sendo capaz de fotoinativar os conídios por pelo menos dois dias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIAMAHARAVO, N.R., **Retention Data. NIST Mass Spectrometry Data Center.**, NIST Mass Spectrometry Data Center, 2014

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

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

AMARAL, M.P.H; VIEIRA, F.P.; LEITE, M.N.; AMARAL, L.H.; PINHEIRO, L.C; FONSECA, B.G.; PEREIRA, M.C.S; VAREJÃO, E.V. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 607-611, 2009.

ASTHANA, A.; TUVESON R. W. Effects of UV and Phototoxins on selected fungal pathogens of Citrus. **Chicago Journals**, v. 153 (3), p. 442-452, 1992.

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.

BAGCI, E.; BASER, K.H.C., Study of the essential oils of *Thymus haussknechtii* Velen and *Thymus kotschyanus* Boiss. et Hohen var. *kotschyanus* (Lamiaceae) taxa from the eastern Anatolian region in Turkey, **Flavour Fragr. J.**, v. 20 (2), p. 199-202, 2005.

BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, D. St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 583-600, 2001.

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.

BERNAL, C.; RODRIGUES, J. A. O.; GUIMARÃES, A. P. P.; RIBEIRO, A. O.; de OLIVEIRA, K. T.; IMASATO, H.; PERUSSI, J. R. Selective Photoinactivation of *C. albicans* and *C. dubliniensis* with hypericin. **Laser Physics**, v. 21 (1), p. 245-249, 2011.

BINTSIS, T.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; ROBINSON, R. K. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 637-645, 2000.

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.

BOGUCKA-KOCKA, A.; KRZACZEK, T. The furocoumarins in the roots of *Heracleum sibiricum* L. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, v. 60 (5), p. 401-403, 2003.

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FERNANDES, E. K. K.; FLINT, S. D.; ROBERTS, D. W. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. **Current Genetics**, v. 2015, p. xx-xx, 2015.

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. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 78, p. 98-108, 2001.

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.

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.

BYLAITE, E.; MEYER, A.S. Characterisation of volatile aroma compounds of orange juices by three dynamic and static headspace gas chromatography techniques, **Eur. Food Res. Technol.**, v. 222 (1-2), p. 176-184, 2006.

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

CIAMPI-GUILLARDI, M.; BALDAUF, C.; SOUZA, A. P.; SILVA JÚNIOR, G. J. da; AMORIM, L. Recent introduction and recombination in *Colletotrichum acutatum* populations associated with citrus postbloom fruit drop epidemics in São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, v. 104, p. 769-778, 2013.

COURTOIS, E.A.; PAINE, C.E.; BLANDINIERES, P.-A.; STIEN, D.; BESSIERE, J.-M.; HOUEL, E.; BARALOTO, C.; CHAVE, J. Diversity of the volatile organic compounds emitted by 55 species of tropical trees: a survey in French Guiana, **J. Chem. Ecol.**, v. 35 (11), p. 1349-1362, 2009.

DAI, T.; FUCHS, B. B.; COLEMAN, J. J.; PRATES, R. A.; ASTRAKAS, C.; DENIS, T. G. St.; RIBEIRO, M. S.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M. R.; TEGOS, G. P. Concepts and principles of photodynamic therapy as na alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-16, 2012.

De SOUZA, S. C.; JUNQUEIRA, J. C.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C. Y.; MUNIN, E.; JORGE, A. O. C. photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 83, p. 34-38, 2006.

De MENEZES, H. D.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; FLINT, S. D.; SILVA JÚNIOR, G. J. da; BACHMANN, L.; RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L. Growth under Visible Light Increases Conidia and Mucilage Production and Tolerance to UV-B Radiation in the Plant Pathogenic Fungus *Colletotrichum acutatum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91 (2), p. 397-402, 2015.

De MENEZES, H. D.; PEREIRA, A. C.; BRANCINI, G. T. P.; LEÃO, H. C.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BACHMANN, L.; WAINWRIGHT, M.; BASTOS, J. K.; BRAGA, G. U. L. Furocoumarins and coumarins photoinactivate *Colletotrichum acutatum* and *Aspergillus nidulans* fungi under solar radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 131, p. 74-83, 2014a.

De MENEZES, H. D.; RODRIGUES, G. B.; TEIXEIRA, S. P.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BACHMANN, L.; WAINWRIGHT, M.; BRAGA, G. U. L. *In vitro* photodynamic inactivation of plant-pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with novel phenothiazinium photosensitizers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80 (5), p. 1623-1632, 2014b.

DiCOSMO, F.; NORTON, R.; TOWERS, G. H. N. Photoinduced fungicidal activity elicited by naturally occurring thiophene derivatives. **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.

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 58, p. 895-900, 1993.

EBERMANN, R.; ALTH, G.; KREITNER, M.; KUBIN, A. Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 36, p. 95-97, 1996.

EICHNER, A.; GOLLMER, A.; SPÄTH, A.; BÄUMLER, W.; REGENSBURGER, J.; KÖNIG, B.; MAISCH, T. Fast and effective inactivation of *Bacillus atrophaeus* endospores using light-activated derivatives of vitamin B2. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, p. 387-396, 2015.

EXAME. EUA barram suco de laranja brasileiro por causa de fungicida. Economia Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/economia/noticias/eua-barram-suco-de-laranja-brasileiro-por-causa-de-fungicida>>. Acesso em: 11 de março de 2015.

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

FISHER, J. F.; TRAMA, L. A. High performance liquid chromatographic determination of some coumarins and psoralens found in citrus peel oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 27, p. 1334-1337, 1979.

FUCHS, B. B.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R.; MYLONAKIS, E. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 2929-2936, 2007.

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

GOMES, M. C.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; FAUSTINO, M. A. F.; FERNANDES, R.; NEVES, M. G. P. M. S.; TOMÉ, A. C.; GOMES, N. C. M.; ALMEIDA, A.; CAVALEIRO, J. A. S.; CUNHA, A.; TOMÉ, J. P. C. Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, p. 1735-1743, 2011.

GONZALES, F. P.; SILVA, S. H.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. L. Photodynamic Inactivation of Conidia of the Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with Methylene Blue and Toluidine Blue. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 653-661, 2010.

HAMMOND, G. S.; STOUT, C. A.; LAMOLA, A. A. Mechanisms of Photochemical Reactions in Solution. XXV. The Photodimerization of Coumarin. **Journal of American Chemical Society**, v. 86 (15), p. 3103-3106, 1964.

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.

HUDAIB, M.; ABURJAI, T. Volatile components of *Thymus vulgaris* L. from wild-growing and cultivated plants in Jordan, **Flavour Fragr. J.**, v 22 (4), p. 322-327, 2007.

HUDAIB, M.; GRAZIA BELLARDI, M.; RUBIES-AUTONELL, C.; FIORI, J.; CAVRINI, V. Chromatographic (GC-MS, HPLC) and virological evaluations of *Salvia sclarea* infected by BBWV-I, **Farmaco**, v. 56 (3), p. 219-227, 2001.

HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Therapeutic potential of plant photosensitizers. **Pharmac. Ther.**, vol. 49, p. 181-222, 1991

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

KAMATOU, G.P.P.; VILJOEN, A.M.; FIGUEIREDO, A.C.; TILNEY, P.M.; VAN ZYL, R.L.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; VAN VUUREN, S.F. Trichomes, essential oil composition and biological activities of *Salvia albanicus Benth.* and *S. dolomitica Codd*, two species from the Cape region of South Africa, **South African J. Botany**, v. 73 (1), p. 102-108, 2007.

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.

LAZAREVIC, J.; RADULOVIC, N.; PALIC, R.; ZLATKOVIC, B. Chemical Analusis of volatile constituents of *Berula erecta* (Hudson) Coville subsp. *erecta* (Apiaceae) from Serbia, **J. Essential Oil. Res.**, v. 22 (3), p. 153-156, 2010.

LEÃO, R. A. C.; 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 Phenols. **Synthesis**, v. 22, p. 3692-3696, 2011.

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.

LÓPEZ-CHICÓN, P.; PAZ-CRISTOBAL, M. P.; REZUSTA, A.; ASPIROZ, C.; ROYO-CAÑAS, M.; ANDRES-CIRIANO, E.; GILABERTE, Y.; AGUT, M.; NONELL, S. On the mechanism of *Candida spp.* Photoinactivation by hipericin. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 11, p. 1099-1107, 2012.

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

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

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

MANTHEY, J. A.; BUSLIG, B. S. Distribution of furanocoumarins in Grapefruit Juice fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5158-5163, 2005.

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

MONDELLO, L.; ZAPPIA, G.; DUGO, P.; DUGO, G.; BONACCORSI, I.; DUGO, G. Identification of complex samples by Fast-GC/MS using linear retention indices in conjunction with the MS-library, **Proceedings**, 23rd ISCC; CD-ROM, 2000, retrieved from <http://www.richrom.com/assets/CD23PDF>

MONTGOMERY, D. C. Design and Analysis of Experiments. 5ª edição, **John Wiley & Sons**, Inc., Nova Iorque, 2000.

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.

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.

PATIL, J.R.; JAYAPRAKASHA, G.K.; MURTHY, K.N.C.; TICHY, S.E.; CHETTI, M.B.; PATIL, B.S. Apoptosis-mediated proliferation inhibition of human colon cancer cells by volatile principles of *Citrus auratifolia*, **Food Chem.**, v. 114 (4), p. 1351-1358, 2014.

PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; YOSHIZAKI, F.; BERTELLI, D.; ROSSI, M.C. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry analysis of the volatile compounds of Evodia species fruits, **J. Chromatogr. A**, v. 1087 (1-2), p. 265-273, 2005.

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

PINHEIRO, P. F.; De QUEIROS, V. T.; RONDELLI, V. M.; COSTA, A. V.; MARCELINO, T. P.; PRATISSOLI, D. Insecticidal activity of citronells grass essential oil on *Frankliniella schultzei* and *Myzus persicae*. **Cienc. Agrotec. Lavras**, v. 37 (2), p. 138-144, 2013.

POTAPENKO, A. Y. New trends in photobiology (Invited Review) Mechanisms of photodynamic effects of furocoumarins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 9, p. 1-33, 1991.

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

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

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

SAWAMURA, M.; SON, U.-S.; CHOI, H.-S.; KIM, M.-S.L.; PHI, N.T.L.; FEARS, M.; KUMAGAI. Compositional changes in commercial lemon essential oil for aromatherapy, **Int. J. Aromatherapy**, v. 14 (1), p. 27-36, 2004.

SHAW, P. E. Review of quantitative analyses of Citrus Essential Oil. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 27 (2), p. 246-257, 1979.

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

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

SILVA, 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.

SILVA JÚNIOR, G. J.; SPÓSITO, M. B.; MARIN, D. R.; AMORIM, L. Efficacy and timing of application of fungicides for control of citrus postbloom fruit drop. **Crop Protection**, v. 59, p. 51-56, 2014a.

SILVA JÚNIOR, G. J.; SPÓSITO, M. B.; MARIN, D. R.; RIBEIRO JÚNIOR, P. J.; AMORIM, L. Spatiotemporal characterization of citrus postbloom fruit drop in Brazil and its relationship to pathogen dispersal. **Plant Pathology**, v. 63, p. 519-529, 2014b.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; et al, Farmacognosia: da Planta ao medicamento, Porto Alegre/Florianópolis Ed.Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999, p. 461-475.

SMIJS, T. G. M.; BOUWSTRA, J. A.; TALEBI, M.; PAVEL, S. Investigation of Conditions involved in the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment. **Journal of antimicrobial therapy**, v. 60, p.750-759, 2007.

SMIJS, T. G. M.; HAAS, R. N. S. V.; LUGTENBURG, J.; LIU, Y.; JONG, R. L. P.; 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.

SMIJS, T. G. M.; MULDER, A. A.; PAVEL, S.; ONDERWATER, J. J. M.; KOERTEN, H. K.; BOUWSTRA, J. A. Morphological changes of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* after photodynamic treatment: a scanning electron microscopy study. **Medical mycology**, v. 46, p. 315-325, 2008.

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

SMIJS, T. G. M.; PAVEL, S.; TALEBI, M.; BOUWSTRA, J. A. Preclinical Studies with 5,10,15-Tris(4-Methylpyridinium)-20-Phenyl-[21H,23H]-Porphine Trichloride for the Photodynamic Treatment of Superficial Mycoses Caused by *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 733-739, 2009.

SMIJS, T. G. M.; SCHUITMAKER, H. J. Photodynamic Inactivation of the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77 (3), p. 556-560, 2003.

SONG, P; TAPLEY JR., K. J. Photochemistry and Photobiology of Psoralens. **Photochemistry and Photobiology**, v. 29, p. 1177-1197, 1979.

SOUKOS, N. S.; FYVIE, L. A. X.; HAMBLIN, M. R.; SOCRANSKY, S. S.; HASAN, T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 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 Hortalças e Frutas**, 2006.

St. DENIS, T. G.; DAI, T.; IZIKSON, L.; ASTRAKAS, C.; ANDERSON, R. R.; HAMBLIN, M. R.; TEGOS, G. P. All you need is light: Antimicrobial photoinactivation as na envolving and emerging discovery strategy against infectious disease. **Virulence**, v. 2 (6), p. 509-520, 2011.

TAKEOKA, G.R.; HOBBS, C.; BYEOUNG-SOO, P. Volatile constituents of the aerial parts of *Salvia apiana* Jepson, **J. Essential Oil. Res.**, v. 22 (3), p. 241-244, 2010.

TAO, N-G.; LIU, Y-J.; ZHANG, M-L. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 1281-1285, 2009.

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.

ULATE-RODRIGUEZ, J.; SHAFER, T. W.; ZOTTOLA, E. A.; DAVIDSON, P. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157:H7, and *Micrococcus luteus* by linear furanocoumarins in a model food system. **Journal of Food Protection**, v. 60 (9), p. 1050-1054, 1997.

VELPULA, N.; MALOTH, K. N.; KODANGAL, S.; CHAPPIDI, V.; GOYAL, S.; LINGAM, S. Photodynamic therapy: A new modality treatment in pre-cancer and cancer patients. **International Journal of Case Reports and Images**, v. 5 (4), p. 250-257, 2014.

VERA, D. M. A.; HAYNES, M. H.; BALL, A. R.; DAI, T.; ASTRAKAS, C.; KELSO, M. J.; HAMBLIN, M. R.; TEGOS, G. P. Strategies to Potentiate Antimicrobial photoinactivation by Overcoming Resistant Phenotypes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 499-511, 2012.

VIEGAS, M. C.; BASSOLI D. G. Utilização do Índice de Retenção Linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. **Química Nova**, v. 30 (8), p. 2031-2034, 2007.

ZHAO, C.X.; LI, X.N.; LIANG, Y.Z.; FANG, H.Z.; HUANG, L.F.; GUO, F.Q. Comparative analysis of chemical components of essential oils from different samples of *Rhododendron* with the help of chemometrics methods, **Chemom. Intell. Lab. Syst.**, v. 82 (1-2), p. 218-228, 2006.

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

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

WU, Y. Y.; SNYDER, E. L. Safety of the blood supply: role of pathogen reduction. **Blood Reviews**, v. 17, p. 111-122, 2003.

APÊNDICES

Apêndice A- Composição do extrato bruto 1, mostrando os Índices de Retenção Linear (LRI) calculados comparados com a literatura. *Índice de Retenção Linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade)

Pico	LRI (calculado)	LRI (literatura)	% área	Substância Sugerida	Fórmula	Identificação	Referência
1	1030	1036	8,30	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	EM e LRI	PINHEIRO et al., 2013
2	1180	1180	3,63	4-Terpinenol	C ₁₀ H ₁₈ O	EM e LRI	HUDAIB; ABURJAI, 2007
3	1194	1189	2,41	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	EM e LRI	HUDAIB; ABURJAI, 2007
4	1368	1369	13,66	Nerol acetato	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	EM e LRI	HUDAIB et al., 2001
5	1387	1389	3,97	7-Epi-Sesquitujeno	C ₁₂ H ₂₄	EM e LRI	COURTOIS et al., 2009
6	1424		2,98	Geranil acetato	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	EM *	
7	1440	1431	13,86	Cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	EM e LRI	PELLATI et al., 2005
8	1480	1489	4,15	β -Bisaboleno	C ₁₅ H ₂₄	EM e LRI	BAGCI; BASER, 2005
9	1513		28,19	Trans-3(10)-caren-2-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	EM *	
10	1591	1589	5,02	Óxido de Cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O	EM e LRI	HUDAIB et al., 2001
11	1615	1624	3,86	(E)- β -Farneseno epóxido	C ₁₅ H ₂₄ O	EM e LRI	LAZAREVIC et al., 2010
12	1995	1992.8	9,98	5,7-Dimetoxicumarina	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	EM e LRI	ANDRIAMAHARAVO, 2014

Apêndice B- Composição do extrato bruto 2, mostrando os Índices de Retenção Linear (LRI) calculados comparados com a literatura. *Índice de Retenção Linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade)

Pico	LRI (calculado)	LRI (literatura)	% área	Substância Sugerida		Identificação	Referência
1	1194	1189	9,22	α -Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	EM e LRI	HUDAIB; ABURJAI, 2007
2	1200	1207	1,87	γ -Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	EM e LRI	PATIL et al., 2009
3	1310		24,00	1, 8- Terpina	$C_{10}H_{20}O_2$	EM *	
4	1332		10,11	Cis-hidrato de terpina	$C_{10}H_{20}O_2$	EM *	
5	1434		5,03	Carvon hidrato	$C_{10}H_{16}O_2$	EM*	
6	1506		3,40	Limoneno-1,2-diol	$C_{10}H_{18}O_2$	EM *	
7	1740	1732,3	10,19	7-Metoxicumarina	$C_{10}H_8O_3$	EM e LRI	ANDRIAMAHARAVO, 2014
8	1996	1992	19,84	5,7-dimetoxicumarina	$C_{11}H_{10}O_4$	EM e LRI	ANDRIAMAHARAVO, 2014
9	2075	2080	8,83	Bergapteno	$C_{12}H_8O_4$	EM e LRI	MONDELLO et al., 2000
12	2255	2250	7,51	Isopimpinellina	$C_{13}H_{10}O_5$	EM e LRI	ANDRIAMAHARAVO, 2014

Apêndice C- Composição do extrato bruto 3, mostrando os Índices de Retenção Linear (LRI) calculados comparados com a literatura. *Índice de Retenção Linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade)

Pico	LRI (calculado)	LRI (literatura)	% área	Substância Sugerida	Fórmula	Identificação	Referência
1	1744		8,19	7-Metoxicumarina	C ₁₀ H ₈ O ₃	EM *	
2	1996	1992,8	45,23	5,7-Dimetoxicumarina	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	EM e LRI	ANDRIAMAHARAVO, 2014
3	2076	2080	22,83	Bergapteno	C ₁₂ H ₈ O ₄	EM e LRI	MONDELLO et al., 2000
4	2166	2162,9	3,88	Etil linoleato	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	EM e LRI	ANDRIAMAHARAVO, 2014
5	2173	2173	4,14	Ácido linolênico	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	EM e LRI	ZHAO et al., 2006
6	2344	2250	15,73	Isopimpinellina	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	EM e LRI	ANDRIAMAHARAVO, 2014

Apêndice D- Composição do extrato bruto 4, mostrando os Índices de Retenção Linear (LRI) calculados comparados com a literatura. *Índice de Retenção Linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade)

Pico	LRI (calculado)	LRI (literatura)	% área	Substância Sugerida	Fórmula	Identificação	Referência
1	1064	1060	3,22	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	EM e LRI	BYLAITE; MEYER, 2006
2	1054	1059	0,54	γ-Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	EM e LRI	HUDAIB et al., 2001
3	1050	1056	3,61	Trans-linalool óxido	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	EM e LRI	TAKEOKA et al., 2010
4	1045	1045	2,61	Cis-linalool óxido	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	EM e LRI	KAMATOU et al., 2007
5	1016		0,75	Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	EM*	
6	1007		1,37	7-Octeno-2,6-diol, 2,6-dimetil-	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	EM*	
7	1004		2,09	2,6-Dimetil-1,7-octadieno-3,6- diol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	EM*	
8	1013		9,11	1,8-Terpina	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	EM*	
9	1018		2,81	Cis-hidrato de terpina	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	EM*	
10	1021		5,58	4-Isopropenil-1-metil-1,2- ciclohexanodiol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	EM*	
11	1023		0,43	Álcool neril	C ₁₀ H ₁₈ O	EM*	
12	1024		0,44	Exo-2-hidroxicineol acetato	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	EM*	

Continua

Continuação

13	1031	6,17	Álcool furfuril	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	EM*
14	1039	2,84	(1S,2S,3R,5S)-(+)-Pinanodiol	C ₁₉ H ₁₈ O ₂	EM*
15	1041	3,9	E-Farneseno epóxido	C ₁₅ H ₂₄ O	EM*
16	1056	3,31	β-Bisaboleno	C ₁₅ H ₂₄	EM*
17	1067	4,53	α-Metil-α-[4-metil-3-pentenil]oxiranometanol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	EM*
18	1116	10,98	p-Metoxi-α-metil cinamaldeído	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	EM*
19	1118	0,84	α-Elemol	C ₁₅ H ₂₆ O	EM*
20	1126	5,28	7-Hidroxycumarina	C ₉ H ₆ O ₃	EM*
21	1147	1,28	5-α-Pregn-9(11)-en-12-ona	C ₂₁ H ₃₂ O	EM*
22	1149	0,36	Guaiol	C ₁₅ H ₂₆ O	EM*
23	1150	0,5	7-Hidroxi-6-metoxi-4-metil-cumarina	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	EM*
24	1157	2,99	2,5-Di-t-amil-p-benzoquinona	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	EM*
25	1191	10,82	7-Methoxi-8-(2-oxo-3-metilbutil)cumarina	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	EM*

Continua

Continuação

26	1204	11,89	2-[2-(4-Metoxifenil)vinil]-3,3-dimetil-3H-indol	C ₁₉ H ₁₉ NO	EM*
27	1226	1,77	Deoxinivalenol	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	EM*

Apêndice E- Composição do extrato bruto 5, mostrando os Índices de Retenção Linear (LRI) calculados comparados com a literatura. *Índice de Retenção Linear não disponível na literatura (identificação baseada apenas no espectro de massas, ou seja, no índice de similaridade)

Pico	LRI (calculado)	LRI (literatura)	% área	Substância Sugerida	Fórmula	Identificação	Referência
1	1132		4,9	Ciclo-octanona	C ₈ H ₁₄ O	EM *	
2	1331		2,93	3,6-Dimetil-2-octanona	C ₁₀ H ₂₀ O	EM *	
3	1347	1342.9	7,1	Limoneno glicol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	EM e LRI	ANDRIAMAHARAVO, 2014
4	1495	1497	1,85	Citronelal	C ₁₀ H ₁₈ O	EM e LRI	SAWAMURA et al., 2004
5	1501		2,14	Tetradecametil-cicloheptasiloxano	C ₁₄ H ₄₂ O ₇ Si ₇	EM *	
6	1507		1,7	4-Isopropenil-1-metil-1,2-ciclohexanodiol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	EM *	
7	1669		2,4	Hexadecametil-ciclooctasioxano	C ₁₆ H ₄₈ O ₈ Si ₈	EM *	
8	1745		14,18	1-Hidroximetil-7,7-dimetilbiciclo[2.2.1]heptan-2-ona	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	EM *	
9	1766		3,14	Biciclo[2.2.1]heptan-2-ol, 2-alil-1,7,7-trimetil-	C ₁₃ H ₂₂ O	EM *	
10	1828		3,36	1,1,1,5,7,7,7-Heptametil-3,3-bis(trimetilsiloxi)tetrasiloxano	C ₁₃ H ₄₀ O ₅	EM *	
11	2144		4,74	4-[3,4-Dimetoxiciclohexil]-n-butanol	C ₁₂ H ₂₄ O ₃	EM *	

Continua

Continuação

12	2276	1,08	[(2-fluorofenil)metil]-1H-Purin-6- amina	$C_{12}H_{10}FN_5$	EM *
13	2310	11,56	1,6,10,14,18,22-Tetracosaheptaen-3- ol, 2,6,10,15,19,23-hexametil-, (E)-	$C_{30}H_{50}O$	EM *
14	2419	1,15	Ferro, monocarbonil-(1,3-butadieno- 1,4-dicarbonico ácido, dietil éster) a,a'-dipiridil	$C_{21}H_{22}FeN_2O_5$	EM *
15	2478	4,38	1-Ciclohexanona, 5-(2-{[1-(1,1- dimetiletil)-1,1-dimetilsilil]oxi}-1- metiletil)-2-metil	$C_{16}H_{32}O_2Si$	EM *
16	2537	1,2	Óleo de silicone	NI	EM *
17	2594	22,35	9-(3,3-Dimetiloxiran-2-il)-2,7- dimetilnona-2,6-dien-1-ol	$C_{15}H_{26}O_2$	EM *
18	2673	9,83	6-Etoxi-6-metil-2-ciclohexenona	$C_9H_{14}O_2$	EM *

Apêndice F – Comparações entre as médias do número de unidades formadoras de colônias de *C. acutatum*. Os conídios foram incubados com o MB por 30 min e, a seguir, expostos à radiação solar por 30 min, 1 e 2 h no dia 16/06/2014. *** Diferença estatística a um nível de 5% de significância.

Comparações	Diferença estimada	Pós-teste de Tukey
Apenas luz (1 h x 2 h)	3733,00	
Apenas luz (1 h x 30 min)	-8400,00	***
Apenas luz (2 h x 30 min)	-12133,00	***
Luz + MB (1 h x 2 h)	-1,00	
Luz + MB (1 h x 30 min)	-53,00	
Luz + MB (2 h x 30 min)	-52,00	
Apenas luz x Luz + MB (1 h)	72066,00	***
Apenas luz x Luz + MB (2 h)	68331,00	***
Apenas luz x Luz + MB (30 min)	80413,00	***
Apenas luz (1 h) x Sem luz e sem FS (0 min)	3933,00	
Apenas luz (2 h) x Sem luz e sem FS (0 min)	7667,00	***
Apenas luz (30 min) x Sem luz e sem FS (0 min)	-4467,00	
Sem luz e sem FS (0 min) x Luz + MB (1 h)	75999,00	***
Sem luz e sem FS (0 min) x Luz + MB (2 h)	75998,00	***
Sem luz e sem FS (0 min) x Luz + MB (30 min)	75946,00	***
Sem luz e sem FS (0 min) x Sem luz e com MB (0 min)	867,00	

Apêndice G - Comparações entre as médias do número de unidades formadoras de colônias de *C. acutatum*. Os conídios foram incubados com o MB por 30 min e, a seguir, expostos à radiação solar por 30 min, 1 e 2 h no dia 17/06/2014. *** Diferença estatística a um nível de 5% de significância.

Comparações	Diferença estimada	Pós-teste de Tukey
Apenas luz (1 h x 2 h)	-3200,00	
Apenas luz (1 h x 30 min)	-12700,00	***
Apenas luz (2 h x 30 min)	-9500,00	***
Luz + MB (1 h x 2 h)		
Luz + MB (1 h x 30 min)		
Luz + MB (2 h x 30 min)		
Apenas luz x Luz + MB (1 h)		
Apenas luz x Luz + MB (2 h)		
Apenas luz x Luz + MB (30 min)	74108,00	***
Apenas luz (1 h) x Sem luz e sem FS (0 min)	9867,00	***
Apenas luz (2 h) x Sem luz e sem FS (0 min)	6667,00	***
Apenas luz (30 min) x Sem luz e sem FS (0 min)	-2833,00	
Sem luz e sem FS (0 min) x Luz + MB (1 h)		
Sem luz e sem FS (0 min) x Luz + MB (2 h)		
Sem luz e sem FS (0 min) x Luz + MB (30 min)	71275,00	***
Sem luz e sem FS (0 min) x Sem luz e com MB (0 min)	6100,00	

Apêndice H - Comparações entre as médias do número de unidades formadoras de colônias de *C. acutatum*. Os conídios foram incubados com o MB por 30 min e, a seguir, expostos à radiação solar por 30 min, 1 e 2 h no dia 14/07/2014. *** Diferença estatística a um nível de 5% de significância.

Comparações	Diferença estimada	Pós-teste de Tukey
Apenas luz (1 h x 2 h)	4600,00	
Apenas luz (1 h x 30 min)	3600,00	
Apenas luz (2 h x 30 min)	1000,00	
Luz + MB (1 h x 2 h)		
Luz + MB (1 h x 30 min)	-1079,00	
Luz + MB (2 h x 30 min)		
Apenas luz x Luz + MB (1 h)	63833,00	***
Apenas luz x Luz + MB (2 h)	66353,00	***
Apenas luz x Luz + MB (30 min)		
Apenas luz (1 h) x Sem luz e sem FS (0 min)	8733,00	
Apenas luz (2 h) x Sem luz e sem FS (0 min)	4133,00	
Apenas luz (30 min) x Sem luz e sem FS (0 min)	5133,00	
Sem luz e sem FS (0 min) x Luz + MB (1 h)	72566,00	***
Sem luz e sem FS (0 min) x Luz + MB (2 h)		
Sem luz e sem FS (0 min) x Luz + MB (30 min)	71487,00	***
Sem luz e sem FS (0min) x Sem luz e com MB (0 min)	-6733,00	

Apêndice I – Comparações entre as médias das unidades formadoras de colônias de *C. acutatum*. Os conídios foram incubados com os diferentes compostos e, a seguir, expostos à radiação solar por 1 h, no dia 14/10/2014. *** Diferença estatística a um nível de 5% de significância

Comparações	Diferença estimada	Pós-teste de Tukey
Apenas luz x Luz + 8-MOP	-27130,00	***
Apenas luz x Luz + cumarina	7067,00	
Apenas luz x Luz + 5,7-dimetoxicumarina	3400,00	
Apenas luz x Luz + mistura de cumarinas	7119,00	***
Apenas luz x Luz + 7-hidroxycumarina	3267,00	
Apenas luz x Luz + isopimpineline	13233,00	***
Apenas luz x Sem luz e com 8-MOP	-8167,00	***
Apenas luz x Sem luz e com cumarina	-8600,00	***
Apenas luz x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-6067,00	
Apenas luz x Sem luz e com mistura de cumarinas	-7433,00	***
Apenas luz x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-8967,00	***
Apenas luz x Sem luz e com isopimpineline	-8800,00	***
Apenas luz x Sem luz e sem FS	-11500,00	***
Luz + 8-MOP x Luz + cumarina	-20064,00	***
Luz + 8-MOP x Luz + 5,7-dimetoxicumarina	-23730,00	***
Luz + 8-MOP x Luz + mistura de cumarinas	-11,00	
Luz + 8-MOP x Luz + 7-hidroxycumarina	-23864,00	***
Luz + 8-MOP x Luz + isopimpineline	-13897,00	***
Luz + 8-MOP x Sem luz e com 8-MOP	-35297,00	***
Luz + 8-MOP x Sem luz e com cumarina	-35730,00	***
Luz + 8-MOP x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-33197,00	***
Luz + 8-MOP x Sem luz e com mistura de cumarinas	-34564,00	***
Luz + 8-MOP x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-36097,00	***
Luz + 8-MOP x Sem luz e com isopimpineline	-35930,00	***
Luz + 8-MOP x Sem luz e sem FS	-38630,00	***
Luz + cumarina x Luz + 5,7-dimetoxicumarina	-3667,00	
Luz + cumarina x Luz + mistura de cumarinas	20052,00	***
Luz + cumarina x Luz + 7-hidroxycumarina	-3800,00	
Luz + cumarina x Luz + isopimpineline	6167,00	
Luz + cumarina x Sem luz e com 8-MOP	-15233,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com cumarina	-15667,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-13133,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	-14500,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-16033,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com isopimpineline	-15867,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e sem FS	-18567,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Luz + mistura de cumarinas	23719,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Luz + 7-hidroxycumarina	-133,00	
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Luz + isopimpineline	9833,00	***

Continua

Continuação

Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com 8-MOP	-11567,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com cumarina	-12000,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-9467,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	-10833,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-12367,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com isopimpinellina	-12200,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e sem FS	-14900,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Luz + 7-hidroxycumarina	-23852,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Luz + isopimpinellina	-13886,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com 8-MOP	-35286,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com cumarina	-35719,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-33186,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com mistura de cumarinas	-34552,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-36086,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com isopimpinellina	-35919,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e sem FS	-38619,00	***
Luz + 7-hidroxycumarina x Luz + isopimpinellina	9967,00	***
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com 8-MOP	-11433,00	***
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com cumarina	-11867,00	***
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-9333,00	***
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	-10700,00	***
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-12233,00	***
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com isopimpinellina	-12067,00	***
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e sem FS	-14767,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com 8-MOP	-21400,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com cumarina	-21833,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-19300,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com mistura de cumarinas	-20667,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-22200,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com isopimpinellina	-22033,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e sem FS	-24733,00	***
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com cumarina	-433,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	2100,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com mistura de cumarinas	733,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-800,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com isopimpinellina	-633,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e sem FS	-3333,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	2533,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	1167,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-367,00	

Continua

Continuação

Sem luz e com cumarina x Sem luz e com isopimpineline	-200,00
Sem luz e com cumarina x Sem luz e sem FS	-2900,00
Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	-1367,00
Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-2900,00
Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com isopimpineline	-2733,00
Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e sem FS	-5433,00
Sem luz e com mistura de cumarinas x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-1533,00
Sem luz e com mistura de cumarinas x Sem luz e com isopimpineline	-1367,00
Sem luz e com mistura de cumarinas x Sem luz e sem FS	-4067,00
Sem luz e com 7-hidroxycumarina x Sem luz e com isopimpineline	167,00
Sem luz e com 7-hidroxycumarina x Sem luz e sem FS	-2533,00
Sem luz e com isopimpineline x Sem luz e sem FS	-2700,00

Apêndice J - Comparações entre as médias das unidades formadoras de colônias de *C. acutatum*. Os conídios foram incubados com os diferentes compostos e, a seguir, expostos à radiação solar por 1 h, no dia 15/10/2014. *** Diferença estatística a um nível de 5% de significância

Comparações	Diferença estimada	Pós-teste de Tukey
Apenas luz x Luz + cumarina	4900,00	
Apenas luz x Luz + 5,7-dimetoxicumarina	4233,00	
Apenas luz x Luz + mistura de cumarinas	26616,00	***
Apenas luz x Luz + 7-hidroxycumarina	667,00	
Apenas luz x Luz + isopimpinellina	1733,00	***
Apenas luz x Sem luz e com 8-MOP	-3667,00	
Apenas luz x Sem luz e com cumarina	-5333,00	
Apenas luz x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-3567,00	
Apenas luz x Sem luz e com mistura de cumarinas	-4867,00	
Apenas luz x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-2633,00	
Apenas luz x Sem luz e com isopimpinellina	-9400,00	***
Apenas luz x Sem luz e sem FS	-6667,00	
Luz + cumarina x Luz + 5,7-dimetoxicumarina	-667,00	
Luz + cumarina x Luz + mistura de cumarinas	21716,00	***
Luz + cumarina x Luz + 7-hidroxycumarina	-4233,00	
Luz + cumarina x Luz + isopimpinellina	12433,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com 8-MOP	-8567,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com cumarina	-10233,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-8467,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	-9767,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-7533,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com isopimpinellina	-14300,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e sem FS	-11567,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Luz + mistura de cumarinas	22382,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Luz + 7-hidroxycumarina	-3567,00	
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Luz + isopimpinellina	12100,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com 8-MOP	-7900,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com cumarina	-9567,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-7800,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	-9100,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-6867,00	
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com isopimpinellina	-13633,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e sem FS	-10900,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Luz + 7-hidroxycumarina	-25949,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Luz + isopimpinellina	-9282,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com 8-MOP	-30282,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com cumarina	-31949,00	***

Continua

Continuação

Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-30182,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com mistura de cumarinas	-31482,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-29249,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com isopimpinellina	-36016,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e sem FS	-33282,00	***
Luz + 7-hidroxycumarina x Luz + isopimpinellina	16667,00	***
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com 8-MOP	-4333,00	
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com cumarina	-6000,00	
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-4233,00	
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	-5533,00	
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-3300,00	
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com isopimpinellina	-10067,00	***
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e sem FS	-7333,00	
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com 8-MOP	-12000,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com cumarina	-22667,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-20900,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com mistura de cumarinas	-22200,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-19967,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com isopimpinellina	-26733,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e sem FS	-24000,00	***
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com cumarina	-1667,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	100,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com mistura de cumarinas	-1200,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	1033,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com isopimpinellina	-5733,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e sem FS	-3000,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	1767,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	467,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	2700,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com isopimpinellina	-4067,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e sem FS	-1333,00	
Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	-1300,00	
Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	933,00	
Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com isopimpinellina	-5833,00	
Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e sem FS	-3100,00	
Sem luz e com mistura de cumarinas x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	2233,00	
Sem luz e com mistura de cumarinas x Sem luz e com isopimpinellina	-4533,00	

Continua

Continuação

Sem luz e com mistura de cumarinas x Sem luz e sem FS	-1800,00
Sem luz e com 7-hidroxycumarina x Sem luz e com isopimpinellina	-6767,00
Sem luz e com 7-hidroxycumarina x Sem luz e sem FS	-4033,00
Sem luz e com isopimpinellina x Sem luz e sem FS	2733,00

Apêndice K- Comparações entre as médias das unidades formadoras de colônias de *C. acutatum*. Os conídios foram incubados com os diferentes compostos e, a seguir, expostos à radiação solar por 1 h, no dia 29/10/2014. *** Diferença estatística a um nível de 5% de significância

Comparações	Diferença estimada	Pós-teste de Tukey
Apenas luz x Luz + cumarina	2867,00	
Apenas luz x Luz + 5,7-dimetoxicumarina	2000,00	
Apenas luz x Luz + mistura de cumarinas	39237,00	***
Apenas luz x Luz + 7-hidroxycumarina	-133,00	
Apenas luz x Luz + isopimpinellina	31300,00	***
Apenas luz x Sem luz e com 8-MOP	-8300,00	
Apenas luz x Sem luz e com cumarina	-8533,00	
Apenas luz x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-3467,00	
Apenas luz x Sem luz e com mistura de cumarinas	-3167,00	
Apenas luz x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-9400,00	***
Apenas luz x Sem luz e com isopimpinellina	-1233,00	
Apenas luz x Sem luz e sem FS	-7533,00	
Luz + cumarina x Luz + 5,7-dimetoxicumarina	-867,00	
Luz + cumarina x Luz + mistura de cumarinas	36370,00	***
Luz + cumarina x Luz + 7-hidroxycumarina	-3000,00	
Luz + cumarina x Luz + isopimpinellina	28433,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com 8-MOP	-11167,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com cumarina	-11400,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-6333,00	
Luz + cumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	-6033,00	
Luz + cumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-12267,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com isopimpinellina	-4100,00	
Luz + cumarina x Sem luz e sem FS	-10400,00	
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Luz + mistura de cumarinas	37237,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Luz + 7-hidroxycumarina	-2133,00	
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Luz + isopimpinellina	29300,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com 8-MOP	-10300,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com cumarina	-10533,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-5467,00	
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	-5167,00	
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-11400,00	***
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com isopimpinellina	-3233,00	
Luz + 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e sem FS	-9533,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Luz + 7-hidroxycumarina	-39370,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Luz + isopimpinellina	-7937,00	
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com 8-MOP	-47537,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com cumarina	-47770,00	***

Continua

Continuação

Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com mistura de cumarinas	-42403,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-48637,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e com isopimpinellina	-40470,00	***
Luz + mistura de cumarinas x Sem luz e sem FS	-46770,00	***
Luz + 7-hidroxycumarina x Luz + isopimpinellina	31433,00	***
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com 8-MOP	-8167,00	
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com cumarina	-8400,00	
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-3333,00	
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	-3033,00	
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-9267,00	***
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e com isopimpinellina	-1100,00	
Luz + 7-hidroxycumarina x Sem luz e sem FS	-7400,00	
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com 8-MOP	-39600,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com cumarina	-39833,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	-34767,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com mistura de cumarinas	-34467,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-40700,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e com isopimpinellina	-32533,00	***
Luz + isopimpinellina x Sem luz e sem FS	-38833,00	***
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com cumarina	-233,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	4833,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com mistura de cumarinas	5133,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-1100,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com isopimpinellina	7067,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e sem FS	767,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina	5067,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	5367,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-867,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com isopimpinellina	7300,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e sem FS	1000,00	
Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com mistura de cumarinas	300,00	
Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-5933,00	
Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e com isopimpinellina	2233,00	
Sem luz e com 5,7-dimetoxicumarina x Sem luz e sem FS	-4067,00	
Sem luz e com mistura de cumarinas x Sem luz e com 7-hidroxycumarina	-6233,00	
Sem luz e com mistura de cumarinas x Sem luz e com isopimpinellina	1933,00	
Sem luz e com mistura de cumarinas x Sem luz e sem FS	-4367,00	

Continua

Continuação

Sem luz e com 7-hidroxycumarina x Sem luz e com isopimpinellina	8167,00
Sem luz e com 7-hidroxycumarina x Sem luz e sem FS	1867,00
Sem luz e com isopimpinellina x Sem luz e sem FS	-6300,00

Apêndice L – Comparações entre as médias das unidades formadoras de colônias de *C. acutatum*. Os conídios foram incubados com os diferentes compostos e, a seguir, expostos à radiação solar por 1 h, no dia 08/09/2014. *** Diferença estatística a um nível de 5% de significância

Comparações	Diferença estimada	Pós-teste de Tukey
Apenas luz x Luz + cumarina	22300,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 1	33833,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 2	30233,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 3	39033,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 4	22333,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 5	22033,00	***
Apenas luz x Sem luz e com 8-MOP	-867,00	
Apenas luz x Sem luz e com cumarina	-1067,00	
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 1	-1367,00	
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 2	-5400,00	
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 3	-1033,00	
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 4	-1867,00	
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 5	-233,00	
Apenas luz x Sem luz e sem FS	-11267,00	***
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 1	11533,00	***
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 2	7933,00	***
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 3	16733,00	***
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 4	33,00	
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 5	-267,00	
Luz + cumarina x Sem luz e com 8-MOP	-23167,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com cumarina	-23367,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 1	-23667,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 2	-27700,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 3	-23333,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 4	-24167,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 5	-24633,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e sem FS	-33567,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Luz + extrato bruto 2	3600,00	
Luz + extrato bruto 1 x Luz + extrato bruto 3	5200,00	
Luz + extrato bruto 1 x Luz + extrato bruto 4	-11500,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Luz + extrato bruto 5	-11800,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com 8-MOP	-34700,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com cumarina	-34900,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 1	-35200,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 2	-39233	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 3	-34867,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 4	-35700,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 5	-36167,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e sem FS	-45100,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Luz + extrato bruto 3	8800,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Luz + extrato bruto 4	-7900,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Luz + extrato bruto 5	-8200,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com 8-MOP	-31100,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com cumarina	-31300,00	***

Continua

Continuação

Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 1	-31600,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 2	-35633,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 3	-31267,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 4	-32100,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 5	-32567,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e sem FS	-41500,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Luz + extrato bruto 4	-16700,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Luz + extrato bruto 5	-17000,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com 8-MOP	-39900,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com cumarina	-40100,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 1	-40400,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 2	-44433,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 3	-40067,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 4	-40900,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 5	-41367,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e sem FS	-50300,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Luz + extrato bruto 5	-300,00	
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com 8-MOP	-23200,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com cumarina	-23400,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 1	-23700,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 2	-27733,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 3	-23367,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 4	-24200,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 5	-24667,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e sem FS	-33600,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com 8-MOP	-22900,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com cumarina	-23100,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 1	-23400,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 2	-27433,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 3	-23067,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 4	-23900,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 5	-24367,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e sem FS	-33300,00	***
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com cumarina	-200,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 1	-500,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 2	-4533,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 3	-167,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 4	-1000,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 5	-1467,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e sem FS	-10400,00	***
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 1	-300,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 2	-433,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 3	33,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 4	-800,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 5	-1267,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e sem FS	-10200,00	***
Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 2	-4033,00	
Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 3	333,00	

Continua

Continuação

Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 4	-500,00	
Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 5	-967,00	
Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e sem FS	-9900,00	***
Sem luz e com extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 3	4367,00	
Sem luz e com extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 4	3533,00	
Sem luz e com extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 5	3067,00	
Sem luz e com extrato bruto 2 x Sem luz e sem FS	-5867,00	
Sem luz e com extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 4	-833,00	
Sem luz e com extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 5	-1300,00	
Sem luz e com extrato bruto 3 x Sem luz e sem FS	-10233,00	***
Sem luz e com extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 5	-467,00	
Sem luz e com extrato bruto 4 x Sem luz e sem FS	-9400,00	***
Sem luz e com extrato bruto 5 x Sem luz e sem FS	-8933,00	***

Apêndice M – Comparações entre as médias das unidades formadoras de colônias dos conídios de *C. acutatum* expostos à radiação solar e aos extratos brutos no dia 09/09/2014.

*** Diferença estatística a um nível de 5% de significância

Comparações	Diferença estimada	Pós-teste de Tukey
Apenas luz x Luz + cumarina	31067,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 1	31100,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 2	28100,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 3	47833,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 4	26433,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 5	15667,00	***
Apenas luz x Sem luz e com 8-MOP	-233,00	
Apenas luz x Sem luz e com cumarina	-633,00	
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 1	-3433,00	
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 2	-3067,00	
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 3	-12800,00	
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 4	-1467,00	
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 5	-6967,00	
Apenas luz x Sem luz e sem FS	-13233,00	***
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 1	33,00	
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 2	-2967,00	
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 3	19767,00	***
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 4	-4633,00	
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 5	-15400,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com 8-MOP	-31300,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com cumarina	-31700,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 1	-34500,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 2	-34133,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 3	-43867,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 4	-32533,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 5	-38033,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e sem FS	-44300,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Luz + extrato bruto 2	-3000,00	
Luz + extrato bruto 1 x Luz + extrato bruto 3	16733,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Luz + extrato bruto 4	-4667,00	
Luz + extrato bruto 1 x Luz + extrato bruto 5	-15433,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com 8-MOP	-31333,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com cumarina	-31733,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 1	-34533,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 2	-34167,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 3	-43900,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 4	-32567,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 5	-38067,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e sem FS	-44333,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Luz + extrato bruto 3	19733,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Luz + extrato bruto 4	-1667,00	
Luz + extrato bruto 2 x Luz + extrato bruto 5	-12433,00	
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com 8-MOP	-28333,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com cumarina	-28733,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 1	-31533,00	***

Continua

Continuação

Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 2	-31167,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 3	-40900,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 4	-29567,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 5	-35067,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e sem FS	-41333,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Luz + extrato bruto 4	-21400,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Luz + extrato bruto 5	-32167,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com 8-MOP	-48067,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com cumarina	-48467,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 1	-51267,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 2	-50900,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 3	-60633,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 4	-49300,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 5	-54800,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e sem FS	-61067,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Luz + extrato bruto 5	-10767,00	
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com 8-MOP	-26667,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com cumarina	-27067,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 1	-29867,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 2	-29500,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 3	-39233,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 4	-27900,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 5	-33400,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e sem FS	-39667,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com 8-MOP	-15900,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com cumarina	-16300,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 1	-19100,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 2	-18733,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 3	-28467,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 4	-17133,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 5	-22633,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e sem FS	-28900,00	***
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com cumarina	-400,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 1	-3200,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 2	-2833,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 3	-12567,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 4	-1233,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 5	-6733,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e sem FS	-13000,00	***
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 1	-2800,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 2	-2433,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 3	-12167,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 4	-833,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 5	-6333,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e sem FS	-12600,00	
Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 2	367,00	
Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 3	-9367,00	
Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 4	1967,00	

Continua

Continuação

Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 5	-3533,00
Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e sem FS	-9800,00
Sem luz e com extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 3	-9733,00
Sem luz e com extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 4	1600,00
Sem luz e com extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 5	-3900,00
Sem luz e com extrato bruto 2 x Sem luz e sem FS	-10167,00
Sem luz e com extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 4	11333,00
Sem luz e com extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 5	5833,00
Sem luz e com extrato bruto 3 x Sem luz e sem FS	-433,00
Sem luz e com extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 5	-5500,00
Sem luz e com extrato bruto 4 x Sem luz e sem FS	-11767,00
Sem luz e com extrato bruto 5 x Sem luz e sem FS	-6267,00

Apêndice N – Comparações entre as médias das unidades formadoras de colônias de *C. acutatum*. Os conídios foram incubados com os diferentes compostos e, a seguir, expostos à radiação solar por 1 h, no dia 10/09/2014. *** Diferença estatística a um nível de 5% de significância

Comparações	Diferença estimada	Pós-teste de Tukey
Apenas luz x Luz + cumarina	2433,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 1	30833,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 2	26267,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 3	47833,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 4	47967,00	***
Apenas luz x Luz + extrato bruto 5	21267,00	***
Apenas luz x Sem luz e com 8-MOP	21167,00	***
Apenas luz x Sem luz e com cumarina	200,00	
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 1	-13800,00	***
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 2	-1633,00	
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 3	-7867,00	
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 4	-5067,00	
Apenas luz x Sem luz e com extrato bruto 5	-14433,00	***
Apenas luz x Sem luz e sem FS	-9067,00	
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 1	6500,00	
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 2	1933,00	
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 3	23633,00	***
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 4	-3067,00	
Luz + cumarina x Luz + extrato bruto 5	-3167,00	
Luz + cumarina x Sem luz e com 8-MOP	-20600,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com cumarina	-24133,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 1	-38133,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 2	-25967,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 3	-32200,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 4	-29400,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e com extrato bruto 5	-38767,00	***
Luz + cumarina x Sem luz e sem FS	-33400,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Luz + extrato bruto 2	-4567,00	
Luz + extrato bruto 1 x Luz + extrato bruto 3	17133,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Luz + extrato bruto 4	-9567,00	
Luz + extrato bruto 1 x Luz + extrato bruto 5	-9667,00	
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com 8-MOP	-27100,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com cumarina	-30633,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 1	-44633,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 2	-32467,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 3	-38700,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 4	-35900,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 5	-45267,00	***
Luz + extrato bruto 1 x Sem luz e sem FS	-39900,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Luz + extrato bruto 3	21700,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Luz + extrato bruto 4	-5000,00	
Luz + extrato bruto 2 x Luz + extrato bruto 5	-5100,00	
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com 8-MOP	-22533,00	***

Continua

Continuação

Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com cumarina	-26067,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 1	-40067,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 2	-27900,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 3	-34133,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 4	-31333,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 5	-40700,00	***
Luz + extrato bruto 2 x Sem luz e sem FS	-35333,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Luz + extrato bruto 4	-26700,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Luz + extrato bruto 5	-26800,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com 8-MOP	-44233,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com cumarina	-47767,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 1	-61767,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 2	-49600,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 3	-55833,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 4	-53033,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 5	-62400,00	***
Luz + extrato bruto 3 x Sem luz e sem FS	-57033,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Luz + extrato bruto 5	-100,00	
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com 8-MOP	-17533,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com cumarina	-21067,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 1	-35067,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 2	-22900,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 3	-29133,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 4	-26333,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 5	-35700,00	***
Luz + extrato bruto 4 x Sem luz e sem FS	-30333,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com 8-MOP	-17433,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com cumarina	-20967,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 1	-34967,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 2	-22800,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 3	-29033,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 4	-26233,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e com extrato bruto 5	-35600,00	***
Luz + extrato bruto 5 x Sem luz e sem FS	-30233,00	***
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com cumarina	-3533,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 1	-17533,00	***
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 2	-5367,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 3	-11600,00	***
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 4	-8800,00	
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e com extrato bruto 5	-18167,00	***
Sem luz e com 8-MOP x Sem luz e sem FS	-12800,00	***
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 1	--14000,00	***
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 2	-1833,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 3	-8067,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 4	-5267,00	
Sem luz e com cumarina x Sem luz e com extrato bruto 5	-14633,00	***
Sem luz e com cumarina x Sem luz e sem FS	-9267,00	
Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 2	12167,00	***

Continua

Continuação

Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 3	5933,00	
Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 4	8733,00	
Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e com extrato bruto 5	-633,00	
Sem luz e com extrato bruto 1 x Sem luz e sem FS	4733,00	
Sem luz e com extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 3	-6233,00	
Sem luz e com extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 4	-3433,00	
Sem luz e com extrato bruto 2 x Sem luz e com extrato bruto 5	-12800,00	***
Sem luz e com extrato bruto 2 x Sem luz e sem FS	-7433,00	
Sem luz e com extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 4	2800,00	
Sem luz e com extrato bruto 3 x Sem luz e com extrato bruto 5	-6567,00	
Sem luz e com extrato bruto 3 x Sem luz e sem FS	-1200,00	
Sem luz e com extrato bruto 4 x Sem luz e com extrato bruto 5	-9367,00	
Sem luz e com extrato bruto 4 x Sem luz e sem FS	-4000,00	
Sem luz e com extrato bruto 5 x Sem luz e sem FS	5367,00	