

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Produção de carotenoides e tolerância ao tratamento fotodinâmico
antimicrobiano em *Colletotrichum abscissum***

Marcelo Ferreira da Cruz

Ribeirão Preto
2019

RESUMO

CRUZ, M. F. **Produção de carotenoides e tolerância ao tratamento fotodinâmico antimicrobiano em *Colletotrichum abscissum***. 2019. 78f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano (TFA) tem se mostrado uma alternativa promissora para o controle de fitopatógenos. Dentre as supostas vantagens do TFA em relação ao tratamento com os antifúngicos convencionais, a mais importante seria a improvável seleção de isolados tolerantes devido ao seu modo de ação inespecífico que compreende a oxidação generalizada de moléculas biológicas. Contudo, não há estudos avaliando a possibilidade de aumento da tolerância ao TFA em fungos. Assim, essa dissertação teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de tolerância ao TFA no fungo fitopatogênico *Colletotrichum abscissum*. Para isso, foram realizados inicialmente sessenta ciclos sucessivos de TFA usando Novo Azul de Metileno (NMBN), um fotossensibilizador fenotiazínico, combinado com a exposição à luz vermelha e seleção de conídios sobreviventes ao TFA. Após o TFA, os conídios de *C. abscissum* sobreviventes foram selecionados e crescidos em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA). A seguir, os conídios foram expostos ao segundo ciclo de TFA. Ao final, a sobrevivência relativa do Ciclo 0 (isolado inicial) e Ciclo 60 (isolado selecionado) foi comparada em diferentes fluências no TFA, variando de 7,3 J cm⁻² a 131,2 J cm⁻², obtidas após exposição à luz vermelha. Devido à alteração na coloração das colônias, foi realizada a identificação e quantificação dos carotenoides de conídios de *C. abscissum* por HPLC-DAD-MS/MS. Além disso, um segundo ciclo sucessivo, com 30 ciclos, foi conduzido independentemente. Um total de 12 carotenoides foram identificados nos conídios de *C. abscissum*: 1 - (15Z) or (15'Z)-neurosporaxanthin; 2 - (13Z) or (13'Z)-neurosporaxanthin; 3 - (Z)-neurosporaxanthin; 4 - (all-E)-neurosporaxanthin; 5 - (15Z) or (15'Z)-neurosporaxanthin methyl ester; 6 - (13Z) or (13'Z)-neurosporaxanthin methyl ester; 7 - (Z)-neurosporaxanthin methyl ester; 8 - (all-E)-neurosporaxanthin methyl ester; 9 - (Z)-g-carotene; 10 - (all-E)-g-carotene; 11 - (all-E)-lycopene e 12 - torulene. Foi observado um aumento na concentração de carotenoides para quatro desses carotenoides mencionados acima após 60 ciclos de seleção. A tolerância ao TFA dos conídios do Ciclo 60 foi 2,5 vezes maior que a do Ciclo 0 a 21,9 J cm⁻². O mesmo não foi observado para a comparação entre Ciclo 0 e 30. Embora o mecanismo molecular envolvido no aumento da tolerância ao APDT e da produção de carotenoides ainda não tenha sido determinado ainda, existe a hipótese de que essas duas características estejam correlacionadas porque carotenoides podem atuar como sequestrantes de oxigênio singlete. O oxigênio singlete é a principal espécie reativa de oxigênio produzida durante o TFA com NMBN. Embora nossos resultados possam ser preocupantes ao TFA, eles não são totalmente inesperados, uma vez que outros fungos como *Cercospora* sp. são naturalmente resistentes ao TFA. Assim, para *C. abscissum*, foi observado um aumento na tolerância ao TFA após 60 ciclos consecutivos de TFA.

Palavras-chave: Tratamento fotodinâmico antimicrobiano, Novo azul de metileno, *Colletotrichum abscissum*, Tolerância ao tratamento fotodinâmico, Carotenoides.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Colletotrichum abscissum*

As espécies do gênero *Colletotrichum* (teleomorfo: *Glomerella*), pertencente ao filo Ascomycota, estão entre os mais importantes fitopatógenos, pois causam doenças em culturas de plantas com relevância econômica, especialmente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, com perdas significativas na produtividade (BRAGANÇA et al., 2016; SUTTON, 1992). As espécies são os principais agentes causais de doenças de frutas na pré e pós-colheita, que são caracterizadas por lesões necróticas, com o centro dos tecidos deprimidos, nas quais são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada (BAILEY; JEGER, 1992; BRAGANÇA et al., 2016; FREEMAN et al., 1998).

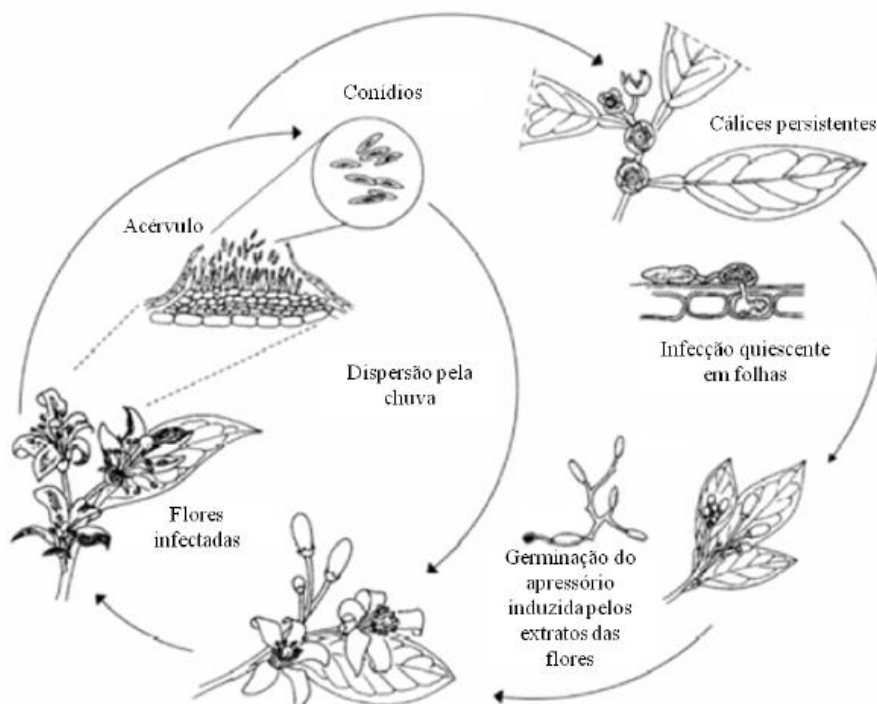
Dentre as espécies do gênero, destaca-se *Colletotrichum abscissum* que é o agente causal da podridão floral dos citros (PFC). O fungo se reproduz assexuadamente por meio da produção de conídios hialinos, cilíndricos, de paredes lisas e asseptados; as hifas vegetativas são de hialinas a pálidas, de paredes lisas, septadas, simples ou ramificadas; formando colônias planas, com margem inteira, micélio aéreo inicialmente branco, tornando-se cinza a preto no centro, com esporulação esparsa (BRAGANÇA et al., 2016; PINHO et al., 2015).

A doença ganha relevância já que a citricultura representa um importante segmento na estrutura socioeconômica do Brasil. O Brasil detém 56% da produção mundial de suco de laranja e exporta 97% do que produz. Com isso, é responsável por 76% de participação no mercado mundial, gerando um PIB de US\$ 6,5 bilhões em todos os elos da sua cadeia produtiva. A citricultura gera cerca de 200 mil empregos diretos e indiretos, do quais somente na safra 2016/2017, foi responsável pela geração de 45 mil novos postos de trabalho (NEVES; TROMBIN, 2017). Atualmente, o setor vem enfrentando uma grave crise, causada por pragas e doenças que foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores nesta década e por perdas de quase 80 milhões de caixas por ano (NEVES et al., 2010).

A PFC é geralmente associada às espécies *C. acutatum* sensu lato e *C. gloeosporioides* sensu lato. Foi realizado um recente estudo filogenético com o *C. acutatum* sensu lato que identificou molecularmente a espécie *Colletotrichum abscissum* como o agente causal da PFC. A doença caracteriza-se pela presença de manchas ou lesões laranja-amarronzadas nas pétalas das flores abertas. Após a

infecção, os frutos recém-formados caem (CROUS et al., 2015; PINHO et al., 2015; ROBERTO; BORGES, 2001; SILVA et al., 2014; TIMMER et al., 1994).

C. abscissum possui um ciclo de vida único em laranjas doces. Nessas plantas, o fungo assume duas formas de parasitismo: a forma biotrófica (com pouco ou nenhum dano aparente para o hospedeiro), que ocorre nas folhas, e a forma necrotrófica (o fungo provoca morte das células do hospedeiro), que ocorre nas flores (PERES et al., 2005). Nas folhas, os conídios do fungo formam estruturas de adesão e de persistência, chamadas apressórios. Quando ocorre o florescimento, a água das chuvas transporta os extratos das flores para as folhas. Esses extratos induzem à germinação do apressório que forma conídios secundários (LEANDRO et al., 2001). Respingos de chuvas transportam esses conídios para as flores, onde germinam e colonizam as pétalas, produzindo conídios primários em acérvulos (conidióforos). Durante a produção dos conídios, ocorre, simultaneamente, a produção de uma matriz gelatinosa que os envolve, constituída predominantemente por polissacarídeos e proteínas solúveis em água. A dispersão dos conídios ocorre pela água da chuva ou de irrigação, por insetos, vento, utensílios agrícolas e manuseio das culturas (De MENEZES et al., 2015; WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). Os sintomas da podridão floral dos citros incluem manchas escuras nas flores, queda prematura dos frutos e persistência dos cálices (PERES et al., 2005). O esquema ilustrativo que demonstra o ciclo da podridão floral dos citros está apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Esquema do ciclo da doença podridão floral dos citros

Fonte: modificado de PERES et al., 2005.

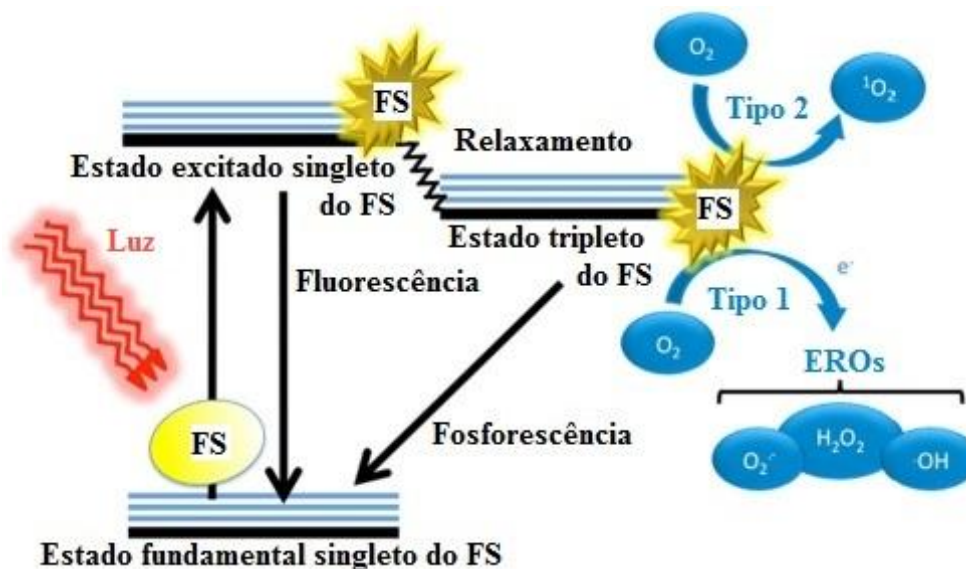
As estratégias para o controle da PFC baseiam-se principalmente na aplicação intensiva de fungicidas durante todo o período de floração, especialmente quando o clima é chuvoso (SILVA Jr. et al., 2011, 2014; TIMMER; PERES, 2015). No Brasil, apenas as classes de antifúngicos de estrobilurinas e triazóis são aprovadas para uso em pomares comerciais de laranja doce (Silva-Junior et al. 2014). O número reduzido de antifúngicos e seu uso constante propiciaram a seleção de linhagens resistentes, tornando o controle da PFC mais difícil e menos eficiente (AVILA-ADAME et al., 2003; WONG et al., 2008; WONG et al., 2007; PERES et al., 2010; DEISING et al., 2008; TIMMER; PERES, 2015). Adicionalmente, a crescente preocupação com a saúde humana e animal e com o meio ambiente tem levado a legislações cada vez mais restritivas em relação ao uso de antifúngicos. Diversos produtos foram banidos do mercado devido à sua elevada toxicidade, que representa riscos para o consumidor e para o meio ambiente (TIMMER; PERES, 2015).

A emergência de linhagens de fungos resistentes aos fungicidas atualmente utilizados, o fato de existirem poucas classes de produtos químicos registrados para o controle da PFC e a necessidade de estratégias para o controle de fitopatógenos

que sejam menos tóxicas aos consumidores de produtos agrícolas e ao meio ambiente têm estimulado a busca por novas estratégias para o controle de fungos fitopatogênicos.

1.2. Tratamento fotodinâmico antimicrobiano

O tratamento fotodinâmico antimicrobiano (TFA) é uma alternativa promissora ao uso de antimicrobianos convencionais e pode ser utilizado tanto para controlar micoses localizadas em humanos e animais como para reduzir populações de patógenos no meio ambiente (DAI et al., 2012; St. DENIS et al., 2011; VERA et al., 2012). O Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano (TFA) está fundamentado na combinação de três elementos: um composto fotossensibilizador, luz com comprimento de onda adequado para excitação do fotossensibilizador e oxigênio molecular (Figura 2). Os fotossensibilizadores (FS) são corantes ou compostos atóxicos ou pouco tóxicos, inativos em seu estado fundamental, que possuem a propriedade de absorverem luz, preferencialmente na região visível. Quando o FS é exposto à luz com comprimento de onda apropriado, ele absorve fótons e alcança um estado de excitação singleto, que pode decair ao estado fundamental com emissão de luz (fluorescência) ou calor, ou ainda ser transformado por cruzamento intersistema ou relaxamento num estado tripleto excitado, de vida mais longa. O estado tripleto excitado pode reagir com o oxigênio molecular através de duas vias fotoquímicas: o fotoprocesso de tipo 1, no qual ocorre transferência de elétrons, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o ânion radical superóxido e radical hidroxila; ou pelo fotoprocesso do tipo 2, que envolve a transferência de energia, resultando na formação de oxigênio singleto. Os produtos de ambos os processos são citotóxicos, capazes de oxidar diferentes biomoléculas (proteínas, lipídios, ácidos nucleicos), levando à morte celular (DAI, 2012; HAMBLIN, 2016; KASHEF; HAMBLIN, 2017). Ao contrário das formas reativas de oxigênio radicalares, que são produzidas por reações enzimáticas durante o metabolismo celular normal e contra as quais existem diversos sistemas de defesa, como as enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e peroxidase; o oxigênio singleto não é um componente normal do metabolismo, sendo inclusive capaz de inativar algumas dessas enzimas, não sendo tolerado pelas células (DAUB; EHRENSHARFT, 2000; KIM et al., 2001).

Figura 2 - Ilustração esquemática do TFA incluindo o Diagrama de Jablonski

Fonte: modificado de Dai et al. (2012, p. 3).

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

Diversos tipos de FS têm sido utilizados no TFA de fungos fitopatogênicos, incluindo produtos sintéticos, como os corantes fenotiazínicos (De MENEZES et al., 2014, 2016; GONZALES et al., 2017; PAZIANI et al., 2019; TONANI et al., 2018). O azul de metileno (MB) é o protótipo dos fenotiazínicos e está bem estabelecida sua baixa toxicidade para humanos (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006). Diversos FS derivados do MB têm sido desenvolvidos e suas características fotoquímicas e fotofísicas favoráveis os tornam potencialmente úteis para o TFA (WAINWRIGHT, 2000; WAINWRIGHT et al., 2015; WAINWRIGHT et al., 2016). O azul de metileno, o azul de toluidina (TBO) e o novo azul de metileno (NMBN) estão entre os

fenotiazínicos mais utilizados no TFA (De MENEZES et al., 2014, 2016; GONZALES et al., 2017; PAZIANI et al., 2019; RODRIGUES et al., 2012; TONANI et al., 2018).

Esses FS possuem uma boa eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio e têm absorção máxima entre 625 e 660 nm (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005; DONNELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008; DUTRA, 2013). Um dos fatores que determinam a seletividade desses compostos catiônicos para as células microbianas é a interação eletrostática entre suas cargas positivas e as cargas negativas da superfície da célula de fungos e bactérias (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006). Sabe-se que FS fenotiazínicos como MB e TBO produzem oxigênio singleto e outras EROs quando expostos à luz vermelha na presença de oxigênio molecular (GONZALES et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012).

Os conídios são estruturas especializadas envolvidas na dispersão e, no caso de espécies patogênicas, como *Colletotrichum*, no reconhecimento e infecção do hospedeiro (BARROS et al., 2010; De MENEZES et al., 2015). Eles diferem de células metabolicamente ativas em características físico-químicas (ex: hidrofobicidade, carga eletrostática), bioquímicas (ex: composição química), fisiológicas (ex: taxa metabólica) e morfológicas (ex: organização e estrutura intracelular). Essas diferenças se devem em parte ao conjunto de proteínas presentes ao longo dos estágios de desenvolvimentos, que assim como as características citadas, variam amplamente entre espécies, isolados e estágios de desenvolvimento; podendo influenciar o TFA (BARROS et al., 2010; GONZALES et al., 2010).

O nosso grupo realizou trabalhos avaliando a eficácia do TFA com fenotiazínicos em conídios de *Colletotrichum*. De Menezes e colaboradores (2014) avaliaram os efeitos de TFA com quatro FS fenotiazínicos (MB, NMBN, TBO e o novo FS fenotiazínico pentacíclico denominado S137) em conídios de *C. abscissum* (antigo *C. acutatum* sensu lato), *C. gloeosporioides* e *Aspergillus nidulans*. A eficácia de TFA com os FS foi inicialmente investigada com base na Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada substância. Os FS S137 e NMBN foram os mais eficazes por apresentarem as menores CIMs, para os quais os efeitos de TFA também foram avaliados na sobrevivência dos conídios. O TFA resultou em uma redução na sobrevivência dos conídios de todas as espécies em aproximadamente cinco ordens de grandeza. A localização subcelular dos mesmos FS em conídios de *C. abscissum*

também foi determinada, mostrando que se acumularam em estruturas citoplasmáticas, como corpos lipídicos. A lavagem dos conídios antes da exposição à luz não impediu a inativação fotodinâmica. Na investigação dos efeitos do TFA em folhas da planta hospedeira *Citrus sinensis* não se observou nenhum dano às folhas da laranjeira.

Gonzales e colaboradores (2017) avaliaram os efeitos do TFA com MB sob radiação solar na germinação e viabilidade de conídios do fungo patogênico *C. abscissum* por meio da realização de experimentos em pétalas e folhas de laranja doce (*Citrus sinensis*) em diferentes estações do ano e condições climáticas. As suspensões de conídios foram depositadas na superfície das folhas e pétalas, tratadas com FS e expostas à radiação solar por apenas 30 min. Os efeitos do TFA nos conídios foram avaliados pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) recuperadas das folhas e pétalas e pela avaliação direta da germinação de conídios na superfície desses órgãos após o tratamento. O TFA com MB e exposição solar inativou e impediu a germinação conídios de *C. abscissum* em folhas e pétalas de citros. A redução da viabilidade dos conídios foi de até três ordens de grandeza e a inativação completa foi alcançada em alguns tratamentos. Visando compreender o mecanismo do TFA nos conídios, foi avaliado seu efeito na permeabilidade da membrana plasmática dos conídios usando uma sonda fluorescente de iodeto de propídio (IP), juntamente com citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, nas quais se constatou dano na membrana plasmática pelo aumento da permeabilidade ao IP. Não foram observados danos às flores ou folhas das laranjas doces após o TFA.

Com a demonstração da eficácia do TFA como controle de fitopatógenos em pétalas e folhas, o método vem sendo aplicado em plantações de laranja doce em estações experimentais de colaboradores para avaliação do efeito do TFA no controle de *C. abscissum* em condições de campo (Figura 3).

Figura 3 - Aplicação do TFA em campo

A: aplicação do FS por aspersão no campo. **B:** aspecto da folha após aplicação do FS. **Fonte:** elaborada pelo autor.

A maior parte dos fungicidas convencionais atua em alvos únicos, o que aumenta a probabilidade da seleção de linhagens resistentes (DEISING; REIMANN. PASCHOLATI, 2008; PERES et al., 2010; WONG et al., 2007; WONG et al., 2008). Por outro lado, o modo de ação inespecífico do TFA, que é baseado na oxidação de todos os tipos de biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas e lipídios), dificulta a seleção de linhagens resistentes. Isso tem sido apontado como uma das grandes vantagens do TFA em comparação com os fungicidas que atuam em alvos moleculares específicos.

Entretanto, deve ser ressaltado que até agora poucos estudos avaliaram sistematicamente a possibilidade de seleção de linhagens tolerantes ao TFA em fungos. Apesar de ainda não ter sido descrita a seleção de linhagens de fungos resistentes ao TFA, está bem estabelecido que a resistência intrínseca das diferentes espécies varia muito em função de suas histórias evolutivas (DAUB; EHRENSHAFT, 2000).

1.3. Tolerância ao TFA

O modo de ação inespecífico do TFA tem sido considerado a principal razão pela qual a seleção de isolados tolerantes não é possível ou provável. Apesar disso, poucos trabalhos foram realizados para avaliar se o uso sucessivo do TFA é de fato seguro quando se trata da possibilidade de seleção de isolados tolerantes (GIULIANI et al., 2009; LAURO et al., 2002; SHIH; HUANG, 2013; TAVARES et al., 2010). Três desses estudos não encontraram aumento na tolerância ao TFA após múltiplos e consecutivos tratamentos (GIULIANI et al., 2009; LAURO et al., 2002; TAVARES et al., 2010). Apenas um estudo encontrou uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que apresentou redução da suscetibilidade ao TFA após dez ciclos consecutivos de tratamento subletal e seleção de sobreviventes (SHIH; HUANG, 2013). No entanto, todos esses trabalhos foram conduzidos com bactérias e o número de ciclos sucessivos não superou vinte (GIULIANI et al., 2009; LAURO et al., 2002; SHIH; HUANG, 2013; TAVARES et al., 2010).

Apesar de diversas espécies de plantas produzirem potentes FS, elas são infectadas por fungos e bactérias fitopatogênicos, indicando que esses patógenos especializados desenvolveram mecanismos capazes de reduzir o efeito da fotossensibilização induzida pela planta hospedeira. Diversos mecanismos envolvidos na tolerância ao TFA já foram descritos em fungos. Algumas espécies de fungos fitopatogênicos são capazes de metabolizar os FS, inativando-os. Desjardins e colaboradores (1989) testaram a tolerância de diversas linhagens (62) do fungo fitopatogênico *Fusarium sambucinum* ao TFA com a furanocumarina xantotoxina e seus precursores. Diversas linhagens (37%) foram altamente tolerantes ao FS, das quais dezesseis foram avaliadas quanto à metabolização da furanocumarina e seus precursores (dezesseis compostos) e a maioria delas foram capazes de metabolizar todos os compostos testados.

Existem mecanismos de tolerância que são genéricos ao TFA e a drogas, incluindo alteração da entrada de FS na célula, mudança no tráfego intracelular e o aumento da expressão de bombas de efluxo (CASAS et al., 2011; DAI et al., 2012). Bombas de efluxo são proteínas de transporte que atuam na expulsão de toxinas de dentro da célula para o meio externo, podendo ser específicas ou não para um determinado substrato, podendo transportar uma série de substratos diversos (KASHEF; HAMBLIN, 2017). Os sistemas de efluxo de drogas dividem-se

principalmente em dois tipos de transportadores: “*major facilitator superfamily*” (MFS), que usam o gradiente eletroquímico através da membrana plasmática para expelir xenobióticos; e “*ATP binding cassette*” (ABC), que usam a ligação de ATP e hidrólise para expulsão das drogas (CANNON et al., 2009). Tegos e Hamblin (2006) foram os primeiros a relatar que FS fenotiazínicos eram substratos de bombas de efluxo resistentes a múltiplas drogas, propondo a combinação de FS com inibidores de bombas de efluxo (IBE) para aumento da eficiência do TFA. Essa hipótese foi confirmada em trabalho posterior, no qual a adição de um IBE antes do FS fenotiazínico TBO aumentou tanto a captação celular do FS quanto do efeito do TFA, que foi significativamente aumentado (TEGOS et al., 2008). O efeito não foi observado para FS não fenotiazínicos.

Prates e colaboradores (2011) estudaram a influência dos sistemas de efluxo de drogas ABC e MFS no TFA de *Candida albicans* com MB por meio da superexpressão e inibição do efluxo de ambos os sistemas separadamente. Os resultados mostraram que o sistema ABC superexpresso foi mais eficiente na redução do influxo de MB e diminuição do efeito do TFA que a sistema MSF na mesma condição. Quanto aos resultados da inibição dos sistemas de efluxo, a absorção de MB e o efeito do TFA foram potencializados para o sistema ABC, indicando sua relação com o efluxo de MB que foi reduzido, ao passo que o influxo de MB e o efeito do TFA foram diminuídos pelo bloqueio do sistema MSF. A hipótese dos autores é que o sistema MSF pode estar ligado tanto ao efluxo quanto ao influxo de MB, razão pela qual a captação de MB foi menor e o efeito do TFA foi reduzido ao invés de potencializado pela adição de IBEs (PRATES et al., 2011).

Acredita-se que a eliminação de FS por bombas de efluxo ocorra em células metabolicamente ativas, devendo ter importância limitada em células quiescentes, como os diversos tipos de conídios de fungos filamentos; uma vez que processos como transcrição e síntese proteica normalmente não ocorrem nos conídios até a germinação (BARROS et al., 2010). De qualquer forma, o TFA continua sendo eficaz nessas estruturas já que muitos FSs não precisam ser ativamente transportados para o interior das células. Adicionalmente, a membrana plasmática e a parede celular também são alvos importantes das EROs produzidas no meio extracelular (GONZALES; MAISCH, 2012; PRATES et al., 2011).

Heat shock (*heat shock proteins*, HSPs) constituem um grupo de chaperonas ubíquas responsáveis pelo redobramento, reparo e reciclagem de proteínas, e

estabilização das membranas lipídicas após estresse celular. O aumento da expressão dessas proteínas também pode aumentar a tolerância ao estresse induzido pelo TFA, pois atuam prevenindo a agregação e desnaturação de proteínas (KASHEF; HAMBLIN, 2017; SHACKLEY et al., 2002). A regulação positiva dessas proteínas aos estresses oxidativo, antibiótico, osmótico e ácido reduz a susceptibilidade dos microrganismos (SINGH et al.; 2007).

Poucos estudos avaliaram o papel dessas proteínas em resposta ao TFA. Bolean e colaboradores (2010) analisaram a expressão de HSPs por *Streptococcus mutans* em diferentes condições. Foi detectada uma expressão de HSP maior nos organismos após o TFA em comparação aos controles expostos somente a luz ou ao FS, que foi semelhante às respostas induzidas pelo estresse osmótico. Assim, eles concluíram que o TFA pode causar efeitos em *S. mutans* como outras condições estressantes. Adicionalmente, a morte celular causada reflete a incapacidade de *S. mutans* em proteger-se suficientemente contra os efeitos deletérios do TFA.

St. Denis e colaboradores (2011) investigaram a indução de respostas protetoras, como HSP, ao TFA. Foi observado um aumento na expressão de HSP em *Escherichia coli* após o TFA subletal com TBO, que foi de sete vezes para a HPS GroEL e de três vezes para a HPS DnaK. Um pré-tratamento térmico, que consistiu na exposição dos organismos a uma temperatura de 50°C por 30 minutos, reduziu a mortalidade ao TFA tanto em *E. coli* quanto em *Enterococcus faecalis*. Para avaliar o papel da chaperona DnaK, foi utilizado um inibidor dessa HPS, que potencializou (embora não significativamente) o efeito do TFA em *E. faecalis*. Por outro lado, não foi observado o mesmo efeito em *E. coli*, provavelmente porque o inibidor não conseguiu penetrar na célula devido à barreira de permeabilidade da parede das bactérias Gram-negativas, já que a parede de lipopolissacarídeos repele moléculas hidrofóbicas como o inibidor utilizado.

A presença de mecanismos capazes de conferir resistência ao TFA, apesar de restrita a um número pequeno de espécies ocorre naturalmente em fungos. Por exemplo, fungos fitopatogênicos pertencentes ao gênero *Cercospora* produzem o FS cercosporina, e são resistentes não só a inativação fotodinâmica pela cercosporina, mas também por outros FS (DAUB et al., 1992; DAUB et al., 2000; HERRERO et al., 2007; SOLLÖD et al., 1992). A cercosporina tem a função de diminuir a população microbiana no local a ser invadido pelo fungo, enfraquecer os sistemas de defesa e

lisar as células do hospedeiro, o que facilita a obtenção de nutrientes pelo fungo (SCHEFFER, 1991). A fotossensibilização pela cercosporina danifica as células do hospedeiro principalmente por meio da peroxidação de lipídios da membrana plasmática pelo oxigênio singlete (DAUB, 1982; DAUB; BRIGGS, 1983).

Enquanto uma concentração micromolar de cercosporina é fatal para a maioria das células, os fungos do gênero *Cercospora* acumulam concentrações milimolares em suas células, sem que isso comprometa sua sobrevivência (JENNS et al., 1989). Esses fungos também são mais tolerantes ao TFA com outros FS, como xantinas e tiazinas. (JENNS et al., 1995). Apesar de o mecanismo de resistência ao oxigênio singlete em *Cercospora* ser claramente multifatorial, algumas vias de resistência são mais bem compreendidas. Estudos foram realizados com mutantes para o gene *SOR1* (*singlet oxygen resistance 1*) são sensíveis à cercosporina e a outros FS (EHRENSHAFT et al., 1998). O gene *SOR1* é essencial para a síntese de vitamina B6 (piridoxina). A piridoxina é produzida em grande quantidade por *Cercospora nicotianae* e tem função de antioxidante durante o estresse fotooxidativo, sendo muito eficiente na inibição de oxigênio singlete (BILSKI et al., 2000; EHRENSHAFT et al., 1999).

1.4. Pigmentos e TFA

O relato de linhagens de *P. aeruginosa* tolerantes ao TFA suscitou a investigação dos mecanismos associados à resistência ao estresse oxidativo induzido pelo TFA. A investigação conduziu à capacidade de produção de pigmentos, combinada com a indução à resposta ao estresse oxidativo, como possível explicação (KASHEF; HAMBLIN, 2017). Para testar essa hipótese, Orlandi e colaboradores (2015) avaliaram a contribuição dos pigmentos na tolerância ao TFA por meio da comparação dos efeitos do estresse foto-oxidativo em linhagens selvagem e mutantes com pigmentação alterada. A hiperprodução de pigmentos tornou as células muito mais tolerantes ao estresse causado pelo TFA, supostamente devido à neutralização das EROs produzidas, embora a tolerância observada não possa ser exclusivamente atribuída à presença do pigmento.

O acúmulo desses pigmentos em fungos geralmente ocorre em estágios sensíveis do ciclo de vida, como em estruturas quiescentes uma vez que atuam como um mecanismo de defesa passivo (BRAGA et al; 2015). Dentre esses

pigmentos, destacam-se os carotenoides, que são pigmentos terpenóides de ocorrência natural, encontrados em fungos de gêneros diversos, como *Mucor*, *Phycomyces*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Ustilago*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Penicillium*, *Aschersonia* e outros (AVALOZ; LIMÓN, 2015; BRAGA et al; 2015). Eles são formados por uma cadeia alifática de polieno constituída por oito unidades de isopreno incluindo ligações duplas conjugadas e são caracterizados por possuírem uma ampla variedade de cores laranja-avermelhadas e absorção de luz na faixa de comprimentos de onda de 300-600 nm (AVALOZ; LIMÓN, 2015; SANDMANN, 1994).

Existem diversas evidências de que esses pigmentos protegem o conídio contra estresses, como radiação solar e estresse oxidativo, incluindo-se aquele causado por processos fotodinâmicos (BRAGA et al., 2015). A cadeia conjugada de polieno dos carotenoides fornece reatividade química contra agentes oxidantes e radicais livres, fazendo com que sejam eficientes sequestrantes de EROs e oxigênio singlete e permitindo a dissipação da energia dos FSs (AVALOZ; LIMÓN, 2015). Devido à sua lipofilicidade, esses pigmentos estão normalmente associados às membranas, atuando na inativação do oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio produzidas durante o processo fotodinâmico (SHIMIZU; EGASHIRA; TAKAHAMA, 1979). Conídios de linhagens selvagens de diversas espécies de fungos são amarelos, laranjas ou avermelhados por acumularem carotenoides (BRAGA et al., 2015).

O papel protetor dos carotenóides contra o oxigênio singlete e outras EROs já foi demonstrado em outros trabalhos (HIRAYAMA et al., 1994), para diversos microrganismos (EPSTEIN; LUSNAK; KAUR, 1998; SCHROEDER; JOHNSON, 1995; TATSUZAWA et al., 2000), entre eles o fungo *Neurospora crassa*. Conídios do tipo selvagem contendo carotenóides de *N. crassa* foram mais tolerantes que os conídios albinos ao TFA com MB (BLANC et al., 1976). A neurosporaxantina é um apocarotenóide anfipático que foi descoberto no ascomiceto *N. crassa*. Também foi encontrado várias espécies do gênero *Fusarium* e *Verticillium*, bem como em *Podospora anserina*. A biossíntese da substância foi investigada detalhadamente em *N. crassa* e *Fusarium fujikuroi*, onde é encontrada junto a outros carotenoides precursores (AVALOS et al., 2012, 2017; AVALOS; LIMÓN, 2015). Ésteres derivados da neurosporaxantina foram relatados em alguns fungos, como um éster

metílico em *Verticillium agaricinum* (AVALOS; LIMÓN, 2015; VALADON; MUMMERY, 1977).

Como indicativo do seu papel fotoprotetor, a síntese de carotenoides é induzida pela presença de luz. É o caso de neurosporaxantina em *N. crassa* e *Fusarium*, na qual o aumento da síntese do carotenoide foi acompanhado pelo incremento da atividade de enzimas antioxidantes, corroborando a associação entre exposição à luz e estresse oxidativo, embora existam exceções (AVALOS; LIMÓN, 2015). Nos casos investigados em que a síntese de carotenoides é estimulada pela luz, a indução é controlada no nível transcricional, como observado na foto-indução de neurosporaxantina em *N. crassa* e *Fusarium*, onde foi constatado um aumento notável nos níveis de mRNA dos genes estruturais envolvidos na biossíntese da substância.

Portanto, diante do eficiente uso do TFA contra *C. abscissum*, da possibilidade de seleção de linhagens tolerantes ao TFA e da escassez de trabalhos avaliando essa hipótese; é fundamental o desenvolvimento de estudos que preencham essa lacuna na literatura.

6. CONCLUSÕES

- A aplicação do TFA com NMBN e luz vermelha em conídios de *C. abscissum* ao longo de ciclos sucessivos selecionou isolados mais tolerantes ao TFA.
- A aplicação do TFA com NMBN e luz vermelha em conídios de *C. abscissum* ao longo de ciclos sucessivos selecionou fenótipos distintos devido ao aumento do conteúdo de carotenoides nos conídios.
- O mecanismo supostamente associado ao aumento da tolerância ao TFA em conídios de *C. abscissum* é o aumento do conteúdo de carotenoides.

7. RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AVALOS, J. et al. Carotenoid Biosynthesis in *Fusarium*. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 3, Jul 2017.

AVALOS, J.; CARMEN LIMÓN, M. Biological roles of fungal carotenoids. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 309-24, 2015.

AVALOS, J.; PRADO-CABRERO, A.; ESTRADA, A. F. Neurosporaxanthin production by *Neurospora* and *Fusarium*. **Methods in Molecular Biology**, v. 898, p. 263-74, 2012.

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

BARROS, B. H. et al. A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. **Fungal Biology**, v. 114, n. 7, p. 572-9, 2010.

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

BLANC, P. L.; TUVESON, R. W.; SARGENT, M. L. Inactivation of carotenoid-producing and albino strains of *Neurospora crassa* by visible light, blacklight, and ultraviolet radiation. **Journal of Bacteriology**, v. 125, n. 2, p. 616-25, 1976.

BOLEAN, M. et al. Photodynamic therapy with rose bengal induces GroEL expression in *Streptococcus mutans*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28 Suppl 1, p. S79-84, 2010.

BRAGA, G. U. et al. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 405-25, 2015.

BRAGANÇA, C. A. D. et al. Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. **Fungal Biology**, v. 120, n. 4, p. 547-561, 2016.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1551-8, 1995.

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.

- CANNON, R. D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291-321, Table of Contents, 2009.
- CASAS, A. et al. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 16, p. 2486-515, 2011.
- CROUS, P. W. et al. Fungal Planet description sheets: 320-370. **Persoonia**, v. 34, p. 167-266, 2015.
- DAI, T. et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as na alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-16, 2012
- DAUB M.; E, BRIGGS, S. P. Changes in tobacco cell-membrane composition and structure caused by the fungal toxin, cercosporin. **Plant Physiology**, p. 763-766, 1983.
- DAUB, M. E. et al. Dihydrocercosporin singlet oxygen production and subcellular localization: a possible defense against cercosporin phototoxicity in *Cercospora*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, n. 2, p. 135-40, 2000.
- DAUB, M. E. et al. Reductive detoxification as a mechanism of fungal resistance to singlet oxygen-generating photosensitizers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 20, p. 9588-92, 1992.
- DAUB, M. E. Peroxidation of tobacco membrane lipids by the photosensitizing toxin, cercosporin. **Plant Physiology**, v. 69, p. 1361-1364, 1982.
- DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. The Photoactivated Cercospora Toxin Cercosporin: Contributions to Plant Disease and Fundamental Biology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 461-490, 2000.
- De MENEZES, H. D. et al. Growth under visible light increases conidia and mucilage production and tolerance to UV-B radiation in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 2, p. 397-402, 2015.
- De MENEZES, H. D. et al. In vitro photodynamic inactivation of plant-pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with Novel Phenothiazinium photosensitizers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1623-32, 2014.
- De MENEZES, H. D. et al. Photodynamic treatment with phenothiazinium photosensitizers kills both ungerminated and germinated microconidia of the pathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium solani*. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 164, p. 1-12, 2016.
- DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 286-295, 2008.
- DESJARDINS, A. E.; SPENCER, G. F.; PLATTNER, R. D. Tolerance and metabolism of furanocoumarins by the phytopathogenic fungus *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*). **Photochemistry**, v. 28, p. 2963-2969, 1989.

DONNELLY, R. F.; McCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal Photodynamic Therapy. **Microbiological Research**, v. 163, p. 1-12, 2008.

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

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

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

EHRENSHAFT, M. et al. A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B6 biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 16, p. 9374-8, 1999.

EHRENSHAFT, M.; JENNS, A. E.; DAUB, M. E. Targeted Gene Disruption of Carotenoid Biosynthesis in *Cercospora nicotianae* Reveals No Role for Carotenoids in Photosensitizer Resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, n. 3, p. 569-575, 1995.

ENZELL, C. R.; FRANCIS, G. W.; LIAAEN-JENSEN, S. Mass spectrometric studies of carotenoids. 2. A survey of fragmentation reactions. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 23, n. 3, p. 727-50, 1969.

EPSTEIN, L.; LUSNAK, K.; KAUR, S. Transformation-Mediated Developmental Mutants of *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*). **Fungal Genetics and Biology**, v. 23, n. 2, p. 189-203, 1998.

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

FU, M. J.; WANG, X. J. Accumulation of carotenoid in *Colletotrichum gloeosporioides* induced by blue light. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v. 45, n. 5, p. 795-797, 2005.

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.

GIULIANI, F. et al. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 637-42, 2010.

GONZALES, F. P. et al. Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 3, p. 653-61, 2010.

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

GONZALES, J. C. et al. Photodynamic inactivation of conidia of the fungus *Colletotrichum abscissum* on *Citrus sinensis* plants with methylene blue under solar radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 176, p. 54-61, 2017.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, p. 67-73, 10 2016.

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

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

HERRERO, S.; AMNUAYKANJANASIN, A.; DAUB, M. E. Identification of genes differentially expressed in the phytopathogenic fungus *Cercospora nicotianae* between cercosporin toxin-resistant and -susceptible strains. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 275, n. 2, p. 326-37, 2007.

HIRAYAMA, O. et al. Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. **Lipids**, v. 29, n. 2, p. 149-150, 1994.

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

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

KASHEF, N.; HAMBLIN, M. R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? **Drug Resistance Updates**, v. 31, p. 31-42, 03 2017.

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

LAURO, F. M. et al. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 7, p. 468-470, 2002.

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

LIMA, W. G. et al. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n. 1, p. 157, 2011.

- MARIUTTI, L. R. B. et al. Further Insights on the Carotenoid Profile of the Echinoderm *Marthasterias glacialis* L. **Marine Drugs**, v. 10, n. 7, 2012.
- NEVES, M. F. et al. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. 1ª ed. Ribeirão Preto: CitrusBR, v. 1, p. 137, 2010.
- NEVES, M. F.; TROMBIM, V. G. **Anuário da Citricultura 2017**. 1ª ed. São Paulo: CitrusBR, v. 1, p. 60, 2017.
- ORLANDI, V. T. et al. Pigments influence the tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to photodynamically induced oxidative stress. **Microbiology**, v. 161, n. 12, p. 2298-309, 2015.
- PAZIANI, M. H. et al. Antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium photosensitizers in non-vertebrate model *Galleria mellonella* infected with *Fusarium keratoplasticum* and *Fusarium moniliforme*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, p. 197-203, 2019.
- PERES, N. A. et al. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, v. 89, n. 8, p. 784-796, 2005.
- PERES, N. A.; SEIJO, T. E.; TURECHEK, W. W. Pre- and post-inoculation activity of a protectant and a systemic fungicide for control of anthracnose fruit rot of anthracnose fruit rot of strawberry under different wetness durations. **Crop Protection**, v. 29, p. 1105-1110, 2010.
- PINHO, D. B. et al. Fungal Planet 357: *Colletotrichum abscissum*: Molecular re-identification of *Colletotrichum acutatum* sensu lato causing citrus postbloom fruit drop in Brazil. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 34, p. 236-237, 2015.
- PRATES, R. A. et al. Effect of virulence factors on the photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, 2013
- ROBERTO, S. R.; BORGES, A. V. Efeito do estágio de desenvolvimento das flores e da aplicação de fungicidas no controle da Podridão Floral dos Citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 306-309, 2001.
- RODRIGUES, G. B., et al. *In vitro* photodynamic inactivation of *Candida* species and mouse fibroblasts with phenothiazinium photosensitizers and red light. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, p. 141-149, 2013.
- SAKAKI, H. et al. A New Carotenoid Glycosyl Ester Isolated from a Marine Microorganism, *Fusarium* Strain T-1. **Journal of natural products**, v. 65, p. 1683-4, 2002.
- SANDMANN, G. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. **European Journal of Biochemistry**, v. 223, n. 1, p. 7-24, 1994.
- SCHEFFER, R.P. Role of toxins in evolution and ecology of plant pathogenic fungi. **Experientia**, v. 47, p. 804-811, 1991.

SCHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 502-507, 1995.

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

SHIH, M. H.; HUANG, F. C. Repetitive methylene blue-mediated photoantimicrobial chemotherapy changes the susceptibility and expression of the outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 4, p. 664-71, 2013.

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

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

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

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

SINGH, V. K. et al. Role for dnaK locus in tolerance of multiple stresses in *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, v. 153, n. Pt 9, p. 3162-73, 2007.

SOLLOD, C. C.; JENNS, A. E.; DAUB, M. E. Cell surface redox potential as a mechanism of defense against photosensitizers in fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 444-9, 1992.

ST DENIS, T. G. et al. Analysis of the bacterial heat shock response to photodynamic therapy-mediated oxidative stress. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 3, p. 707-13, 2011.

SUTTON, D. A. *Tamias amoenus*. **Mammalian Species**, n. 390, p. 1-8, 1992.

TATSUZAWA, H. et al. Quenching of singlet oxygen by carotenoids produced in *Escherichia coli* – attenuation of singlet oxygen-mediated bacterial killing by carotenoids. **FEBS Letters**, v. 484, n. 3, p. 280-284, 2000.

TAVARES, A. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. **Marine Drugs**, v. 8, n. 1, p. 91-105, 2010.

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

TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 196-203, 2006.

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

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

TONANI, L. et al. In vitro susceptibilities of *Neoscytalidium* spp . sequence types to antifungal agents and antimicrobial photodynamic treatment with phenothiazinium photosensitizers. **Fungal Biology**, v. 122, p. 436-448, 2018.

TURCSI, E.; NAGY, V.; DELI, J. Study on the elution order of carotenoids on endcapped C18 and C30 reverse silica stationary phases. A review of the database. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 47, p. 101-112, 2016.

VALADON, L. R. G. et al. Taxonomic implications of the carotenoids of *Iodophanus carneus*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 1, p. 187-190, 1980.

VALADON, L. R. G.; MUMMERY, R. S. Natural β -apo-4'-carotenoic acid methyl ester in the fungus *Verticillium agaricinum*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 5, p. 613-614, 1977.

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

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

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

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

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

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

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

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