

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA CHEVONICA VANDRESEN

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO* PROMOVIDA POR DERIVADOS
PORFIRÍNICOS CATIÔNICOS EM *Colletotrichum lindemuthianum* E
*Colletotrichum truncatum***



CURITIBA
2017

CAMILA CHEVONICA VANDRESEN

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO* PROMOVIDA POR DERIVADOS
PORFIRÍNICOS CATIÔNICOS EM *Colletotrichum lindemuthianum* e
*Colletotrichum truncatum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Woranovicz Barreira
Co-orientador: Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves

CURITIBA
2017

Vandresen, Camila Chevonica

Inativação fotodinâmica *in vitro* promovida por derivados porfirínicos catiônicos em *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum* / Camila Chevonica Vandresen – Curitiba, 2017.

113 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Sandra Woranovicz Barreira

Coorientador: Professor Dr. Alan Guilherme Gonçalves

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde.
Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Colletotrichum*. 2. Espectrofluorimetria. 3. Porfirinas. I. Barreira, Sandra Woranovicz. II. Gonçalves, Alan Guilherme. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 547.593



TERMO DE APROVAÇÃO

CAMILA CHEVONICA VANDRESEN

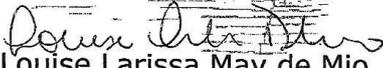
Título: **"INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA IN VITRO
PROMOVIDA POR DERIVADOS PORFIRÍNICOS CATIONICOS
EM *Colletotrichum lindemuthianum* E *Colletotrichum
truncatum*"**

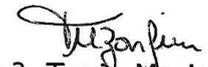
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutora, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof^a. Dra. Sandra Mara Woranóvitz Barreira
Orientadora


Prof. Dr. José Domingos Fontana
Universidade Tecnológica Federal do Paraná


Prof^a. Dra. Thais Martins Guimarães de Francisco
Universidade Federal do Paraná


Prof^a. Dra. Louise Larissa May de Mio
Universidade Federal do Paraná


Prof^a. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 16 de fevereiro de 2017.

Aos meus pais Roberto e Rozilda e ao meu marido Ivadir.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos, primeiramente a Deus, pelo dom vida e pela oportunidade de realizar esse trabalho e dar mais um passo na minha vida acadêmica. Aos meus pais, Roberto e Rozilda e a meu marido, Ivadir, pelo apoio, compreensão, paciência e incentivo em todos os momentos. À minha prima irmã Juliana Chevônica pela confiança.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Professora Sandra Barreira, por trazer a linha de pesquisa e por me orientar e me guiar com tanto zelo e dedicação nessa jornada, sempre mostrando soluções com carinho, apoio e infinita compreensão. Ao meu co-orientador, Professor Alan Gonçalves, pelo incentivo e colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

A todos que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, que foi construído com a colaboração de muitos. A todo o grupo de pesquisa das porfirinas, sem exceção, pela parceria e constante colaboração. Aos Professores Miguel Nosedá, Diogo Ducatti e Maria Eugênia Duarte, do Departamento de Bioquímica da UFPR e aos colegas de Pós-Graduação, especialmente às queridas Lais Guanaes e Juliana Dallagnol.

À Embrapa, pelo fornecimento dos micro-organismos e colaboração, em nome do Dr. Luciano Cota, Dra. Adriane Wendland e Dra. Marta Mendes.

À Professora Tania Maria Bordin Bonfim, pela disponibilidade, apoio, carinho e atenção em toda a parte microbiológica e pelas valiosas contribuições durante o desenvolvimento do trabalho e na qualificação. Aos Professores Thais Francisco e Fabio Murakami pela constante colaboração na parte microbiológica e cálculos.

À Professora Louise Larissa May De Mio pelas contribuições a esta tese na qualificação.

Aos Professores da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições a esta tese na defesa.

Aos técnicos do Departamento de Farmácia pela carinhosa acolhida. À Luciane Rossa, pela constante colaboração no preparo de meios e materiais. À minha amiga Juliana Freitas, companheira incansável em todos os momentos, obrigada pelo suporte, carinho e companheirismo.

À Andressa Veiga, pela sincera amizade, carinho, dedicação, paciência e pela prontidão para ajudar sempre.

Aos alunos de Iniciação Científica, Roberta Souza e Geison Tibera, pelo auxílio na síntese das porfirinas.

Ao Professor Roberto Pontarolo pela disponibilidade da utilização da estrutura do Centro de Bioequivalência em Farmácia e aos colegas do CEB UFPR, especialmente à Letícia Cerqueira e Flávia Degaut pelo auxílio e disponibilidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos e ao CNPq, Pronex Carboidratos e Fundação Araucária pelo suporte financeiro. À Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e todos seus membros pela estrutura e por permitir a realização desse trabalho. Ao Setor de Ciências Biológicas pelo fornecimento do microscópio para realização das análises e ao Departamento de Bioquímica, pelo auxílio nas análises por Espectrofluorimetria.

“Para aqueles que creem, nenhuma explicação é necessária, para aqueles que não creem, nenhuma explicação é possível.”

Santo Inácio de Loyola

RESUMO

A produção de grãos no Brasil representa um dos pilares da agricultura no país, atingindo níveis de 178 milhões de toneladas na última safra. Dentre as culturas, se destacam o feijão, característico da alimentação brasileira e a soja, aplicada na alimentação humana e em processos industriais. Perdas na produção podem ser geradas por doenças, como a antracnose, que é causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magnus) em feijão e *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) em soja e pode proporcionar destruição total das culturas quando existem condições adequadas para esses patógenos. As estratégias de controle não são totalmente eficientes devido à variabilidade genética mostrada pelos micro-organismos e por sua alta capacidade de sobrevivência no meio ambiente. Além disso, os danos à saúde pública e ao meio ambiente causados pelos fungicidas demandam a busca por ferramentas auxiliares para controle da doença. Por essa razão, a Inativação Fotodinâmica (IFD) pode representar uma alternativa. A metodologia utiliza a associação entre um fotossensibilizador, luz e oxigênio e objetiva a destruição seletiva de determinado alvo biológico, como micro-organismos. Dentre os fotossensibilizadores empregados estão as porfirinas e seus derivados, especialmente aqueles contendo cargas positivas em sua estrutura química, que mostraram eficientes resultados quando aplicados na IFD. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência desta técnica *in vitro* utilizando cinco derivados porfirínicos catiônicos estruturalmente relacionados (Mono-Py⁺, Di-trans-Py⁺, Di-cis-Py⁺, Tri-Py⁺ e Tetra-Py⁺) em conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum*, assim como determinar a Concentração Letal 50% (CL 50) e Concentração Letal 90% (CL 90) para os diferentes derivados e avaliar a interação entre esses e os micro-organismos. Com esse propósito, os experimentos foram realizados empregando suspensões de conídios quantificadas em 10⁵ conídios.mL⁻¹. As concentrações dos fotossensibilizadores foram inferiores a 2,0 μmol.L⁻¹ com fluência de 90 J.cm⁻². Além dos ensaios de IFD, três tipos de experimentos controles foram executados simultaneamente: controle claro, controle escuro e branco. A CL50 e CL90 foram determinadas de acordo com a curva de IFD empregando equação da reta correspondente. A interação entre os fitopatógenos e as porfirinas foi verificada por meio de avaliação por espectrofluorimetria e microscopia de fluorescência. Todos os derivados foram capazes de promover a inativação significativa *in vitro* de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum*. Os derivados que mostraram os menores valores de CL50 e CL90 em relação a ambos os fitopatógenos foram aqueles com duas cargas positivas, Di-trans-Py⁺ e Di-cis-Py⁺. Não foram evidenciadas diferenças significativas entre os controles avaliados, indicando que a inativação ocorreu devido à IFD e não aos seus componentes isoladamente. A interação entre os patógenos e as porfirinas foi variável e pode ser relacionada à estrutura química e ao número de cargas positivas presentes nos derivados. Os resultados promissores da IFD *in vitro* empregando porfirinas catiônicas em conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum* devem ser comparados no futuro com ensaios *in vivo* para avaliar aplicação da IFD como auxiliar no controle da antracnose no Brasil.

Palavras-chave: *Colletotrichum lindemuthianum*. *Colletotrichum truncatum*. Inativação fotodinâmica. Porfirinas catiônicas.

ABSTRACT

Grain production represents one of the pillars of the Brazilian agriculture, which have reached 178 million tons in the last harvest season. Among the agricultural products, beans are one of the most important Brazilian food and soybean is applied in human food and industrial processes. Losses in production can be generated by diseases as anthracnose, which is caused by *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magnus) in beans and *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) in soybean. These microorganisms can cause total losses of crops when there are adequate conditions for them. Control strategies are not completely efficient due to the genetic variability shown by the microorganisms and their survival on the environment. In addition, damage to human health and the environment caused by fungicides require the search of different methods in order to control the disease. For this reason, Photodynamic Inactivation (PDI) may represent an alternative for microorganism control. The methodology uses the association between a photosensitizer, light and oxygen, which aims the selective destruction of a specific biological target, such as microorganisms. Porphyrins and their derivatives (especially those containing positive charges in their chemical structure) are photosensitizers that showed efficient results when applied to the PDI. The aim of the present study was to evaluate the efficiency of *in vitro* PDI using five structurally related cationic porphyrin derivatives (Mono-Py⁺, Di-*trans*-Py⁺, Di-*cis*-Py⁺, Tri-Py⁺ and Tetra-Py⁺) in conidia of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Colletotrichum truncatum*, as well as to determine the lethal concentration for 50% and 90% of conidia (LC50 and LC90) for the different derivatives and to evaluate the interaction with the microorganisms. For this purpose, the experiments were carried out using conidial suspensions containing 10⁵ conidia. mL⁻¹. The concentrations of the photosensitizers were less than 2.0 μmol.L⁻¹ and a fluence of 90 J.cm⁻². In addition to the PDI assays, three types of control experiments were performed simultaneously: light control, dark control and blank. The LC50 and LC90 were determined according to the PDI curve employing correspondent linear regression. The interaction between phytopathogens and porphyrins was verified by spectrofluorimetry and fluorescence microscopy. All derivatives were able to promote the significant inactivation of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Colletotrichum truncatum* conidia *in vitro*. The derivatives that showed the lowest values of LC50 and LC90 in relation to both phytopathogens were those with two positive charges, Di-*trans*-Py⁺ and Di-*cis*-Py⁺. There were no significant differences among the evaluated controls, indicating that the inactivation occurred due to PDI and not to its components alone. The interaction between the microorganisms and the porphyrins was variable and can be related to the chemical structure and the number of charges of derivatives. The promising results of *in vitro* PDI employing cationic porphyrins in conidia of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Colletotrichum truncatum* should be compared in the future with *in vivo* assays to evaluate the application of PDI as an aid in the control of anthracnose in Brazil.

Key-words: *Colletotrichum lindemuthianum*. *Colletotrichum truncatum*. Photodynamic Inactivation. Cationic porphyrins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – MAPA AGRÍCOLA DA PRODUÇÃO BRASILEIRA DE FEIJÃO TOTAL	21
FIGURA 2 – MAPA AGRÍCOLA DA PRODUÇÃO BRASILEIRA DE SOJA	21
FIGURA 3 – ESQUEMA DAS FASES DE INFECÇÃO POR UM PATÓGENO HEMIBIOTRÓFICO INTRACELULAR DE <i>Colletotrichum</i> spp.	26
FIGURA 4 – SINTOMAS DE ANTRACNOSE EM FOLHAS (A) E VAGENS DE FEIJÃO (B) ACOMETIDAS POR <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	27
FIGURA 5 – VAGENS DE SOJA (<i>Glicine max</i>) AFETADAS POR ANTRACNOSE (<i>Colletotrichum truncatum</i>).	28
FIGURA 6 – DIAGRAMA MODIFICADO DE JABLONSKI DEMONSTRANDO OS MECANISMOS DE REAÇÕES ENVOLVIDOS NA IFD	34
FIGURA 7 – ESTRUTURA BÁSICA DO MACROCICLO PORFIRÍNICO	37
FIGURA 8 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA PORFIRINA TETRA-PY ⁺ COM INDICAÇÃO DA BANDA SORET E DAS BANDAS Q.....	38
FIGURA 9 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS AVALIADOS POR VANDRESEN et al. (2016).....	42
FIGURA 10 – ESQUEMA DAS ETAPAS DE SÍNTESE DAS MESO-TETRA-ARILPORFIRINAS CATIÔNICAS AVALIADAS COMO FOTOSSENSIBILIZADORES.....	49
FIGURA 11 – LUMACARE MODELO LC 122A.....	51
FIGURA 12 – ESQUEMA DEMONSTRANDO O PROCEDIMENTO DA IFD <i>IN VITRO</i>	51
FIGURA 13 – VAGEM DE FEIJÃO com sintomas de ANTRACNOSE (A) E ASPECTO DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143) EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO BATATA DEXTROSE (B).....	58
FIGURA 14 – GRÃO DE SOJA COM ANTRACNOSE DEMONSTRANDO A PRESENÇA DE COLÔNIAS (A) E <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133) EM MEIO SÓLIDO FARINHA DE AVEIA (B).	59
FIGURA 15 – ESQUEMA DA ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE CONÍDIOS PARA CONTAGEM EM PLACAS	61

FIGURA 16 – COLÔNIAS de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143) (a) E <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133) (b) NO MEIO MEIO SÓLIDO SABOURAUD DEXTROSE.....	62
FIGURA 17 – INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA <i>IN VITRO</i> DE CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143) EMPREGANDO CINCO MESO-TETRA-ARIL PORFIRINAS CATIÔNICAS ESTRUTURALMENTE RELACIONADAS.....	68
FIGURA 18 – INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA <i>IN VITRO</i> DE CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133) EMPREGANDO CINCO MESO-TETRA-ARIL PORFIRINAS CATIÔNICAS ESTRUTURALMENTE RELACIONADAS.....	70
FIGURA 19 – GRÁFICOS DEMONSTRANDO AS LINHAS DE TENDÊNCIA NA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA <i>IN VITRO</i> DE CONÍDIOS de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143) (UFC.mL ⁻¹) EMPREGANDO DERIVADOS PORFIRÍNICOS CATIÔNICOS.....	74
FIGURA 20 – GRÁFICOS DEMONSTRANDO AS LINHAS DE TENDÊNCIA NA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA <i>IN VITRO</i> DE CONÍDIOS de <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133) (UFC. mL ⁻¹) EMPREGANDO DERIVADOS PORFIRÍNICOS CATIÔNICOS.....	76
FIGURA 21 – INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> ENTRE FOTOSSENSIBILIZADORES E CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143) NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE LAVAGEM APÓS TRINTA MINUTOS DE INCUBAÇÃO NO ESCURO.....	79
FIGURA 22 – INTERAÇÃO ENTRE FOTOSSENSIBILIZADORES E CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133) NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE LAVAGEM APÓS TRINTA MINUTOS DE INCUBAÇÃO NO ESCURO.....	82
FIGURA 23 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143) NA AUSÊNCIA DE PORFIRINAS.....	85
FIGURA 24 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143) NA PRESENÇA DE MONO-PY ⁺ , DI-TRANS-PY ⁺ , DI-CIS-PY ⁺ E TRI-PY ⁺	87

FIGURA 25 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143) NA PRESENÇA DE TETRA-PY ⁺	88
FIGURA 26 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143) NA PRESENÇA DE TETRA-PY ⁺ EM MAIOR CONCENTRAÇÃO.....	89
FIGURA 27 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133) NA AUSÊNCIA DE PORFIRINAS	90
FIGURA 28 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133) NA PRESENÇA DE MONO-PY ⁺ , DI-TRANS-PY ⁺ E DI-CIS-PY ⁺	91
FIGURA 29– MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133) NA PRESENÇA DE TRI-PY ⁺ E TETRA PY ⁺	92
FIGURA 30 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS PORFIRINAS DIPIRIDILADAS E SUAS DIFERENÇAS	94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –FOTOESTABILIDADE DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS.	42
TABELA 2 - GERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE PELAS PORFIRINAS MONO-PY ⁺ , DI-TRANS-PY ⁺ , DI-CIS-PY ⁺ , TRI-PY ⁺ ; TETRA-PY ⁺	43
TABELA 3 – CONCENTRAÇÕES DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS CATIÔNICOS EMPREGADAS NOS ENSAIOS DE IFD <i>IN VITRO</i> EM <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143) e <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133).....	50
TABELA 4 – CONCENTRAÇÕES DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS CATIÔNICOS EMPREGADAS NOS CONTROLES ESCUROS <i>IN VITRO</i> EM <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143) e <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133).....	52
TABELA 5 –COMPRIMENTOS DE ONDA (nm) EMPREGADOS PARA EXCITAÇÃO DAS PORFIRINAS NO ENSAIO DE INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> ENTRE FOTOSSENSIBILIZADORES E CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum</i> spp.	54
TABELA 6 – INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA <i>IN VITRO</i> DE CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143) (CL) E <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133) (CT): CONTROLES E VALORES DE CL50 e CL90.....	63
TABELA 7 – CONCENTRAÇÃO LETAL 50% (CL 50) E CONCENTRAÇÃO LETAL 90% (CL 90) PARA CINCO DERIVADOS PORFIRÍNICOS CATIÔNICOS EM CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143).....	75
TABELA 8 – CONCENTRAÇÃO LETAL 50% (CL 50) E CONCENTRAÇÃO LETAL 90% (CL 90) PARA CINCO DERIVADOS PORFIRÍNICOS CATIÔNICOS EM CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133)	77

LISTA DE SIGLAS

AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
Di-*cis*-Py⁺ - Iodeto de 15,20-difenil-5,10-(*N*-metilpiridino-4-il)porfirina
Di-*trans*-Py⁺ - Iodeto de 10,20-difenil-5,15 (*N*-metilpiridino-4-il)porfirina
DMSO – dimetilsulfóxido
Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis
IFD – Inativação Fotodinâmica
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mono-Py⁺ - Iodeto de 10,15,20-trifenil-5 (*N*-metilpiridino-4-il)porfirina
SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SINDIVEG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal
Tetra-Py⁺ - Iodeto de *tetraquis*-5,10,15,20 (*N*-metilpiridino-4-il)porfirina
TFS – Tampão Fosfato Salina
TXRED – filtro Texas Red
Tri-Py⁺ - Iodeto de 20-fenil-5,10,15 (*N*-metilpiridino-4-il)porfirina
UFC – Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 Geral.....	19
1.1.2 Específicos	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 A PRODUÇÃO DE GRÃOS NO BRASIL	20
2.1.1 A produção e demanda de feijão e soja no Brasil	20
2.2 A IMPORTÂNCIA DAS CULTURAS DO FEIJÃO E DA SOJA	22
2.3 DOENÇAS E SUA INFLUÊNCIA NAS CULTURAS DE FEIJÃO E SOJA	23
2.4 ANTRACNOSE E <i>Colletotrichum</i> spp.	24
2.4.1 Aspectos gerais e processo de infecção	25
2.4.2 Sintomatologia e Patogênese.....	26
2.4.3 Métodos de controle para antracnose	28
2.5 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA	31
2.5.1 Definição e aplicações.....	31
2.5.2 Componentes e processo de destruição celular.....	33
2.6 PORFIRINAS COMO FOTOSSENSIBILIZADORES.....	36
2.6.1 Características estruturais e químicas	36
2.6.2 Porfirinas e fotossensibilização	38
2.2.3 Porfirinas catiônicas e Inativação Fotodinâmica de fitopatógenos	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 MICRO-ORGANISMOS.....	45
3.1.1 Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético	45
3.1.2 Obtenção de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e <i>Colletotrichum truncatum</i>	46
3.1.3 Meios de cultura e soluções	46
3.1.4 Reativação	47
3.1.5 Crescimento	47
3.1.6 Preparo da suspensão de conídios	48
3.1.7 Conservação	48
3.2 DERIVADOS PORFIRÍNICOS	49
3.2.1 Armazenamento e avaliação na IFD	49

3.3 FONTE LUMINOSA	50
3.4 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA <i>IN VITRO</i>	51
3.4.1 Análise gráfica e estatística.....	53
3.4.2 Cálculo da Concentração Letal 50% e Concentração Letal 90%	53
3.3 INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> ENTRE PORFIRINAS CATIÔNICAS E CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum</i> spp.	54
3.3.1 Avaliação por espectrofluorimetria	54
3.3.2 Avaliação por microscopia de fluorescência.....	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 MICRO-ORGANISMOS.....	57
4.1.1 Cultivo de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143) e <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133).....	57
4.1.2 Contagem em placas após IFD	61
4.2 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA <i>IN VITRO</i>	63
4.2.1 Intensidade luminosa.....	63
4.2.2 Derivados porfirínicos.....	66
4.3 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA <i>IN VITRO</i> DE CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum</i> <i>lindemuthianum</i> (1143) e <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133).....	66
4.3.1 Inativação fotodinâmica <i>in vitro</i> de conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143).....	67
4.3.2 Inativação Fotodinâmica <i>in vitro</i> de conídios de <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133).....	69
4.4 CONCENTRAÇÃO LETAL 50% e CONCENTRAÇÃO LETAL 90%	72
4.4.1 Concentração Letal 50% e Concentração Letal 90% na IFD de porfirinas catiônicas para conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143)	73
4.4.2 Concentração Letal 50% e Concentração Letal 90% na IFD de porfirinas catiônicas para conídios de <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133).....	75
4.5 INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> ENTRE PORFIRINAS CATIÔNICAS E CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum</i> spp.	78
4.5.1 Avaliação por espectrofluorimetria	78
4.5.1.1 Interação <i>in vitro</i> entre fotossensibilizadores e <i>Colletotrichum</i> <i>lindemuthianum</i> (1143).....	79
4.5.1.2 Interação <i>in vitro</i> entre fotossensibilizadores e <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG 133).....	82

4.5.2 Avaliação por microscopia de fluorescência.....	84
4.5.2.1 Microscopia de fluorescência de porfirinas catiônicas e Colletotrichum lindemuthianum (1143).....	85
4.5.2.2 Microscopia de fluorescência de porfirinas catiônicas e Colletotrichum truncatum (ERG133).....	89
4.6 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE	93
5 CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país predominantemente agrícola, onde as culturas de feijão e soja são destaque na economia brasileira, tanto para o mercado interno para exportação. (BRASIL, 2016a). Assim, as enfermidades que atingem esses vegetais refletem diretamente na economia do país. A antracnose, doença causada plantas por fungos filamentosos *Colletotrichum* spp., representa uma das principais enfermidades que ocasionam danos às plantações e perdas significativas na produtividade em vários Estados brasileiros. (EMBRAPA, 2009; BRASIL, 2016a).

Dentre os grãos produzidos no país, se destacam o feijão e a soja, amplamente utilizados na alimentação brasileira. Na safra de 2015/2016, a produção desses grãos no país atingiu níveis de milhões de toneladas. (CONAB, 2016). A antracnose, que causa múltiplos prejuízos às culturas, também afeta esses vegetais. Nesse caso, as espécies *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magnus) e *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) acometem o feijão (*Phaseolus vulgaris*), e a soja (*Glycine max*), respectivamente. (BACKMAN; WILLIAMS; CRAWFORD, 1982; BALARDIN; JAROSZ; KELLY, 1997).

Dentre as medidas de controle empregadas para a antracnose estão a utilização de práticas culturais, resistência varietal e aplicação de fungicidas. (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). Porém, essas não são sempre efetivas. O patógeno sobrevive no solo e em restos de cultura, reduzindo a efetividade da rotação de culturas. Além disso, a variabilidade genética mostrada por *Colletotrichum lindemuthianum* “dificulta a obtenção de variedades com resistência durável”. (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005, p. 339). No caso da utilização de fungicidas, além dos impactos ambientais e de saúde relacionados ao emprego desses compostos (SOARES, 2010), a resistência dessas espécies a fungicidas comumente utilizados na agricultura está descrita na literatura (SARTORATO, 2006; TORRES-CALZADA et al., 2015). Além disso, os fungos demonstram elevada variabilidade morfológica e patogênica. (BIGIRIMANA; HÖFTE, 2001; DAMASCENO E SILVA; DE SOUZA; ISHIKAWA, 2007), que dificulta o controle adequado da enfermidade.

Considerando essa dificuldade de contenção da antracnose, se faz necessária a busca por uma metodologia que auxilie no controle da doença e que esteja atrelada à geração de mínimos danos ambientais e de saúde. Nesse sentido,

a inativação fotodinâmica pode representar uma ferramenta eficaz para inativação dos fitopatógenos.

Em um processo fotodinâmico há a utilização de três componentes específicos: luz em comprimento de onda adequado, um fotossensibilizador e oxigênio atmosférico. (OCHSNER, 1997; BONNETT; MARTÍNEZ, 2001). Essa associação objetiva a destruição seletiva de alvos biológicos, como os micro-organismos. Quando são relacionados esses alvos, é empregada a nomenclatura de inativação fotodinâmica. (GAD et al., 2004).

O dano celular é resultado da produção de espécies reativas de oxigênio e suas interações oxidativas e letais com macromoléculas celulares, como lipídios. Essas espécies são geradas por meio da interação entre luz e o fotossensibilizador que resulta em reações de transferência de energia, a qual interage com o oxigênio molecular dando origem às espécies oxidantes (BONNETT; MARTÍNEZ, 2001; DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008; JORI et al., 2011).

O procedimento vem demonstrando bons resultados frente a vários micro-organismos, entre eles os fungos filamentosos. (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005; GOMES et al., 2011; ALVES et al., 2013). Dentre os compostos fotossensibilizadores empregados estão as porfirinas, que contêm em sua estrutura básica um macrociclo aromático com elevado grau de conjugação (MILGROM, 1997). Os derivados porfirínicos vem sendo indicados como adequados fotossensibilizadores na fotoinativação de micro-organismos. Está descrito na literatura que substituições no macrociclo que favorecem a solubilidade em meio aquoso e a presença de cargas positivas na estrutura do derivado porfirínico contribuem para a efetividade da inativação fotodinâmica desses alvos biológicos (PERUSSI, 2007; CAMINOS; DURANTINI, 2008).

Tendo em vista tais resultados promissores, a inativação fotodinâmica de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum* empregando como fotossensibilizadores derivados porfirínicos catiônicos pode contribuir com o manejo da antracnose em feijão e soja, além de reduzir danos ambientais e à saúde, que são ocasionados pelos compostos fungicidas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Verificar a eficiência da inativação fotodinâmica (IFD) *in vitro* em fitopatógenos.

1.1.2 Específicos

- Realizar a IFD *in vitro* empregando derivados porfirínicos catiônicos *meso*-substituídos em conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum*.
- Determinar a Concentração Letal 50% e a Concentração Letal 90% na IFD de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum* empregando as cinco *meso*-tetra-aril-porfirinas catiônicas estruturalmente relacionadas como fotossensibilizadores.
- Verificar a interação entre os fotossensibilizadores e os conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum* pelas técnicas de espectrofluorimetria e microscopia de fluorescência.
- Analisar a relação estrutura atividade das porfirinas na IFD das espécies dos fitopatógenos em estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A PRODUÇÃO DE GRÃOS NO BRASIL

A agricultura representa um pilar fundamental na economia do Brasil. Dentre as atividades agrícolas, é acentuada a produção de grãos. De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016), a produção de grãos no país atingiu níveis de 178 milhões de toneladas na safra 2015/2016, com média de produção de 180 milhões de toneladas nas últimas cinco safras. (CONAB, 2016). Nesses valores estão inclusas as culturas de verão, como amendoim, arroz, girassol, milho e, com ênfase neste trabalho, feijão e soja.

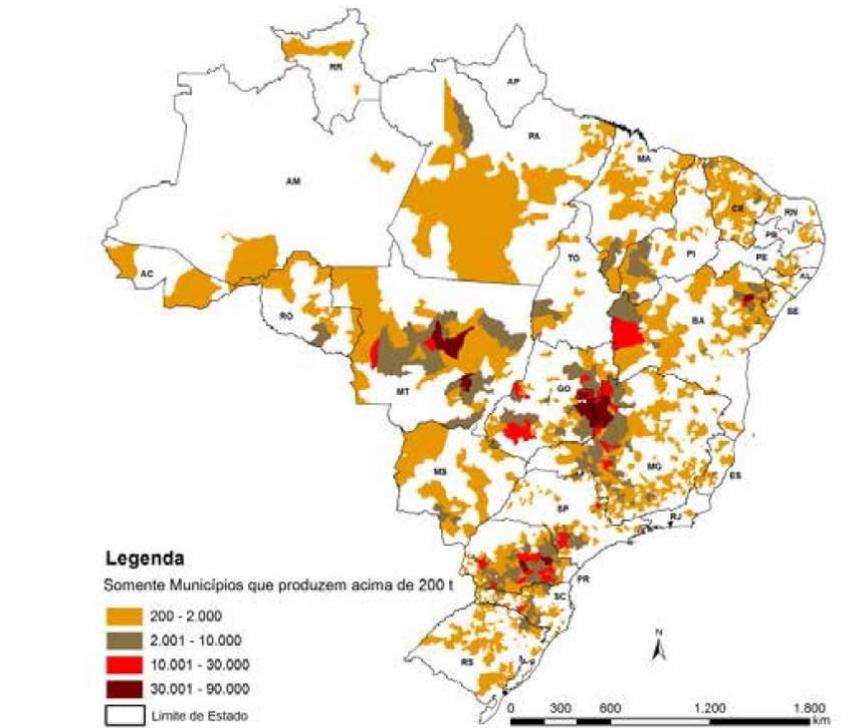
2.1.1 A produção e demanda de feijão e soja no Brasil

O feijão tem destaque na produção brasileira, uma vez que o país está entre os principais produtores mundiais do grão. A produção mundial de feijão atingiu valores em torno de 23,1 milhões de toneladas em 2013. (CONAB, 2015). De acordo com dados da Conab (CONAB, 2016), durante a safra 2015/2016, no Brasil, foram produzidas 2,5 milhões de toneladas de feijão. A Região Sul contribuiu com uma produção aproximada de 828 mil toneladas. Por sua vez, o Estado do Paraná produziu 528 mil toneladas, que representam 21% do total da produção nacional, sendo o maior Estado produtor do grão no país (FIGURA 1).

Além do feijão, a cultura da soja se sobressai dentre os demais grãos no Brasil. A cultura da soja foi a principal cultura produzida no país, sendo responsável por aproximadamente 53% da produção total. (CONAB, 2016).

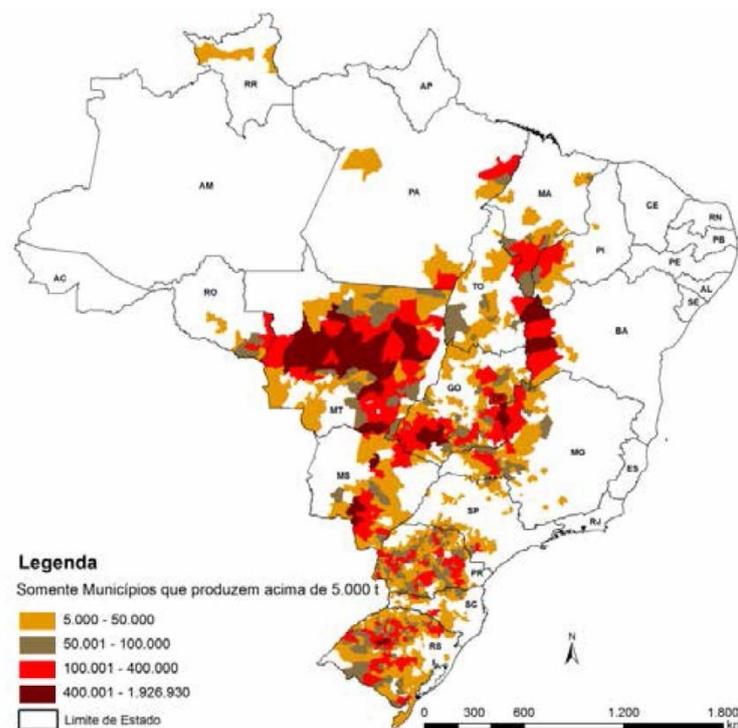
O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, permanecendo com produção inferior apenas em relação aos Estados Unidos. Na safra 2015/2016 foram produzidas mundialmente 312 milhões de toneladas de soja. No Brasil, na mesma safra, foram produzidas 95 milhões de toneladas. Dessas, 35 milhões são provenientes da Região Sul e aproximadamente 17 milhões do Estado do Paraná. (FIGURA 2). (CONAB, 2016).

FIGURA 1 – MAPA AGRÍCOLA DA PRODUÇÃO BRASILEIRA DE FEIJÃO TOTAL



FONTE: Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB. (2016)

FIGURA 2 – MAPA AGRÍCOLA DA PRODUÇÃO BRASILEIRA DE SOJA



FONTE: Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB. (2016)

Segundo os mapas agrícolas, está caracterizada a significativa contribuição do Estado do Paraná na produção de ambos os grãos no âmbito nacional.

Em referência à demanda desses grãos, a correspondente ao feijão está especialmente relacionada ao consumo interno do grão, tendo em vista que, na última safra, 3 milhões de toneladas de feijão foram destinadas ao consumo interno no país e apenas 65 mil foram exportadas (CONAB, 2016). A Conab relaciona que a baixa expressão comercial a nível mundial do grão está relacionada ao fato dos países produtores consistirem também nos principais consumidores e, além disso, são destacadas as diferentes preferências alimentares entre os países.

Já a soja mostra um perfil de demanda diferenciado, onde a exportação apresenta níveis consideráveis e similares ao consumo brasileiro. A exportação foi superior à observada para o feijão e está relacionada à soja em grãos, farelo e óleo de soja. Para consumo interno, foram utilizadas 45 milhões de toneladas de grãos de soja, 16 milhões de farelo e 6 milhões de óleo de soja. Em relação ao consumo, as exportações de soja foram de 57 milhões de toneladas (grãos), 15,9 milhões (farelo) e 1,6 milhões (óleo). (CONAB, 2016).

2.2 A IMPORTÂNCIA DAS CULTURAS DO FEIJÃO E DA SOJA

A cultura do feijão é de extrema importância, uma vez que, em países da América Latina, África e Ásia, o grão consiste em uma fonte proteica de baixo custo para a população (MESQUITA et al., 2007). O Brasil é um dos países importantes do mundo quando se refere à produção e ao consumo de feijão (CONAB, 2015). O grão é um dos principais alimentos consumidos pela população, sendo descrito como a fonte primária de proteínas na dieta humana no país (BROUGHTON et al., 2003; MESQUITA et al., 2007).

Por sua vez, a soja, embora seu uso mais conhecido seja o óleo refinado, ao ser utilizada na alimentação humana, faz parte da composição de vários produtos, como exemplo embutidos. A proteína da soja é muito utilizada na produção de massas, cereais, alimentação para bebês e produtos dietéticos. Ainda, a partir da soja é obtida a lecitina de soja, um emulsificante usado na indústria alimentícia. Além dessa aplicação, o farelo de soja é utilizado para obtenção de ração animal. (EMBRAPA, 2016).

Mandarino e Carrão-Panizzi (2016) evidenciaram que os derivados de soja, como a farinha, a proteína texturizada e o extrato de soja conferem, quando associados a cereais em alimentos, uma adequada quantidade de aminoácidos essenciais.

Considerando a importância das aplicações de ambas as culturas na economia brasileira, fatores que prejudicam a produção de feijão e soja devem ser controlados. Dentre essas condições adversas são reconhecidas as doenças vegetais.

2.3 DOENÇAS E SUA INFLUÊNCIA NAS CULTURAS DE FEIJÃO E SOJA

A doença pode ser entendida como uma “interferência em processos fisiológicos da planta, levando-a ao desempenho anormal em suas funções vitais, como na absorção e transporte da água e elementos minerais, na síntese do seu alimento ou na sua utilização”. (REZENDE et al., 2011, p. 38). Quando um agente nocivo afeta uma planta, qualquer demonstração das reações do vegetal a esse agente pode ser considerada como um sintoma. A evidência externa das estruturas dos patógenos no tecido afetado é denominada sinal. (REZENDE et al., 2011).

Existem várias enfermidades que atingem os vegetais e refletem em perdas produtivas significativas (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN-FILHO, 2011). Para a soja, as doenças são consideradas como um dos principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos da cultura e, dependendo da região e condições climáticas, as perdas produtivas podem atingir níveis de 100%. (EMBRAPA, 2013).

Dentre as doenças relacionadas ao feijão pode ser citadas a mancha-angular, causada por *Phaeoisariopsis griseola* Sacc; ferrugem, onde o patógeno é *Uromyces appendiculatus* (Pers), oídio, causada por *Erysiphe polygoni* DC., entre outras. (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

Para a soja, estão relacionadas, de maneira similar, doenças que refletem diretamente na produtividade e são causadas por diversos patógenos. (ALMEIDA et al., 2005). Exemplos consistem na ferrugem da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow (ALMEIDA et al., 2005); seca da vagem, causada por *Fusarium* spp.; mofo branco, onde o patógeno é *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) e mancha parda, causada por *Septoria glycines* Hemmi, entre outras. (EMBRAPA, 2013).

Além das citadas, dentre as doenças que afetam ambas as culturas, está presente a antracnose, que ocasiona perdas na produtividade e apresenta difícil controle. (BRASIL, 2016a). Além disso, a antracnose nessas culturas é transmitida por sementes. (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; ALMEIDA et al., 2005).

Na cultura do feijoeiro, a doença é relacionada como uma das que demonstram maior importância. (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). Na cultura da soja, é considerada como a “principal doença que afeta a fase inicial de formação das vagens”. (ALMEIDA et al., 2005, p. 578).

Os patógenos causadores são fungos filamentosos *Colletotrichum* spp. e a gravidade da doença é refletida em suas consequências, pois quando em condições climáticas favoráveis a doença pode gerar perdas de até 100% das culturas de feijão (RAVA; SARTORATO, 1994; BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2007) e soja. (ALMEIDA et al., 2005; EMBRAPA, 2013).

A antracnose da soja é considerada uma doença fúngica destrutiva ocasionando consideráveis perdas produtivas em nível mundial (SANT’ANNA et al., 2010). A doença está relacionada à redução da germinação e viabilidade das sementes, ao tombamento da planta (BEGUM et al., 2010), além de considerável decréscimo do número de vagens, já sendo descritas perdas totais em plantações. (HENNING et al., 2005).

Os efeitos da antracnose em soja foram avaliados recentemente por Dias, Pinheiro e Café Filho (2016) onde os autores evidenciaram correlação significativa entre a produtividade e a incidência da doença no norte do Brasil. A cada aumento de 1% na doença, 90 quilogramas de grãos foram perdidos a cada hectare.

2.4 ANTRACNOSE E *Colletotrichum* spp.

O processo de infecção, a patogênese do micro-organismo, sintomatologia e os métodos de controle empregados são aspectos a serem considerados na avaliação da doença.

2.4.1 Aspectos gerais e processo de infecção

Colletotrichum spp. inclui patógenos de plantas de elevada importância que causam enfermidades em vários vegetais (CANNON et al., 2012) e estão primariamente descritos como causadores da antracnose. Segundo o autor, os micro-organismos atingem uma grande quantidade de hospedeiros, incluindo feijão e soja. O fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum* afeta o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (BALARDIN; JAROSZ; KELLY, 1997) e *Colletotrichum truncatum*, soja (*Glycine max* (L.) Merr). (BACKMAN; WILLIAMS; CRAWFORD, 1982). As espécies são pertencentes ao Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Sordariomycetes*; Ordem *Hypocreomycetidae*, Família *Glomerellaceae*. (INDEX FUNGORUM, 2016).

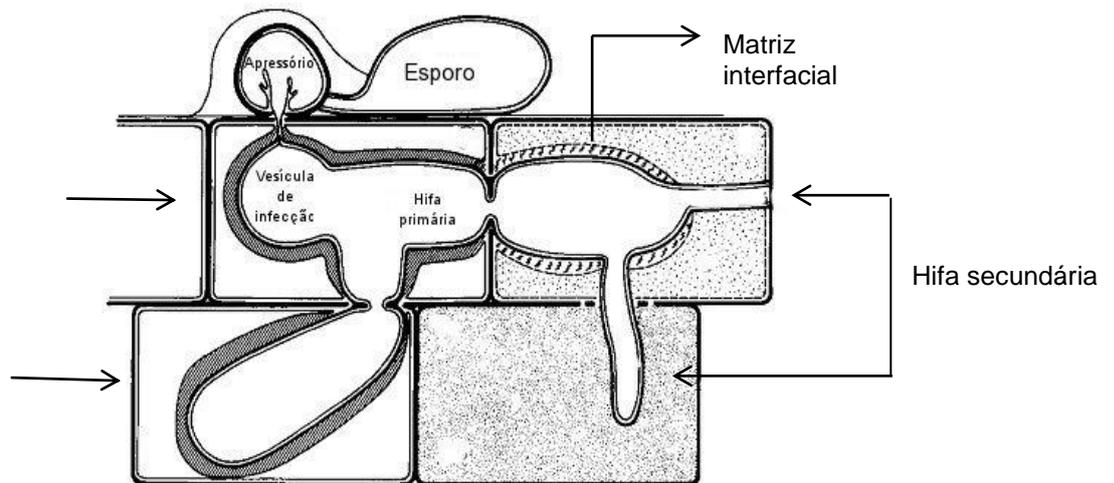
Essas espécies representam patógenos hemibiotróficos intracelulares, exibindo estágios de infecção compostos por biotrofismo e necrotrofismo. No primeiro, a nutrição fúngica é realizada por meio de células vivas do hospedeiro e no segundo, a nutrição se processa a partir de células do hospedeiro mortas pelo próprio fungo. (PERFECT et al., 1999; BHADAURIA et al., 2011).

Nesses micro-organismos, a infecção se inicia com a adesão e germinação dos conídios à superfície do hospedeiro culminando na formação dos tubos germinativos. Posteriormente é observado o desenvolvimento do apressório melanizado que forma vesículas e penetra diretamente na cutícula vegetal, dando origem à hifa primária. A seguir, a hifa cresce entre a membrana plasmática das células vegetais e a parede celular. Após a colonização, a hifa primária biotrófica coloniza novas células do mesofilo vegetal, tornando-se constricta quando passa através da parede celular. É observada uma matriz interfacial separando a membrana plasmática da célula vegetal da parede celular fúngica. Dessa forma, as células infectadas permanecem viáveis por certo período de tempo. Aproximadamente 48 horas após a penetração inicial a hifa secundária necrotrófica é formada e a matriz que circundava a hifa primária se desintegra. Finalmente, a hifa secundária necrotrófica secreta enzimas que degradam a parede celular vegetal e ocorre rapidamente a expansão das lesões necróticas (FIGURA 3) (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985; PERFECT et al., 1999).

No ciclo da doença, além de iniciarem o processo de infecção, os conídios detêm papel fundamental na disseminação. Esses estão embebidos em uma

substância gelatinosa hidrossolúvel e a partir da chuva são disseminados para outros locais e ali se tornam fonte de inoculo. (RAVA, SARTORATO, 1994).

FIGURA 3 – ESQUEMA DAS FASES DE INFECÇÃO POR UM PATÓGENO HEMIBIOTRÓFICO INTRACELULAR DE *Colletotrichum* spp.



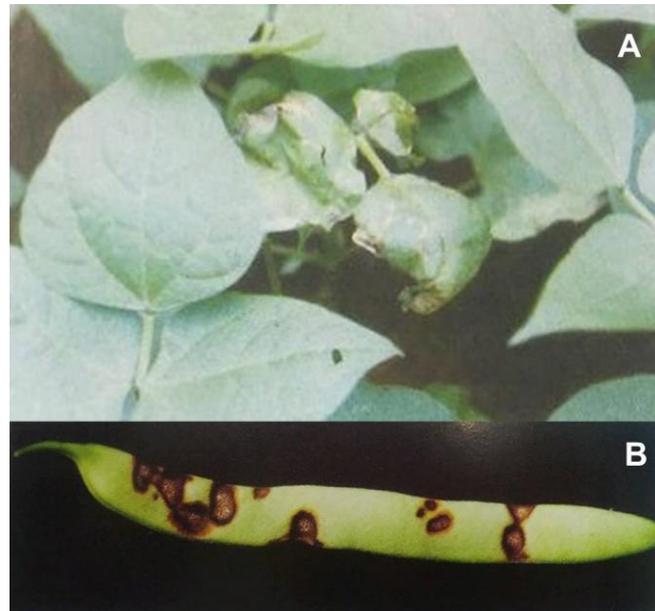
FONTE: adaptado de PERFECT et al. (1999)

2.4.2 Sintomatologia e Patogênese

Em relação ao fungo filamentosso *Colletotrichum lindemuthianum* e antracnose em feijão, em toda a parte aérea da planta podem ser visualizados sintomas. Aqueles típicos consistem em “lesões necróticas de coloração marrom escura nas nervuras na face inferior das folhas”. (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005, p. 338). Quando a doença atinge maiores proporções, pode ocorrer necrose de parte do tecido foliar. Nas vagens, as lesões são em geral circulares e deprimidas e mostram coloração marrom, com os bordos escuros. O centro dessas lesões pode apresentar uma coloração mais clara devido à esporulação do fungo. (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). (FIGURA 4, p.26).

Dentre os sintomas e suas consequências, a antracnose da soja pode ocasionar queda das vagens ou deterioração das sementes quando há atraso na colheita. Em períodos de alta umidade, as partes infectadas ficam cobertas por pontuações negras que correspondem às frutificações do micro-organismo. (HENNING et al., 2005). (FIGURA 5, p. 28).

FIGURA 4 – SINTOMAS DE ANTRACNOSE EM FOLHAS (A) E VAGENS DE FEIJÃO (B) ACOMETIDAS POR *Colletotrichum lindemuthianum*



FONTE: (A): KIMATI et al. (2005); (B): AMORIM; REZENDE; BERGAMIN-FILHO (2011).

A patogênese de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão está evidenciada desde a década de 1980. Os fitopatógenos são capazes de produzir enzimas que degradam a parede celular vegetal e facilitam a entrada dos patógenos no tecido. (YAVAD et al., 2009). Dentre essas enzimas se destaca a pectina liase, que catalisa uma reação de β -eliminação que resulta na formação de oligalacturonídeos 4,5-insaturados enquanto outras enzimas atuam na sequência para degradar completamente a pectina. (YAVAD et al., 2009). A produção de pectina liase por *Colletotrichum lindemuthianum* foi relatada. (WIJESUNDERA et al., 1989). Mais tarde, a mesma produção foi investigada em fungos filamentosos patogênicos e não patogênicos, onde a geração de pectina liase se mostrou mais veloz e em quantidade duas vezes superior no isolado patogênico quando comparado ao não patogênico. (HERNÁNDEZ-SILVA et al., 2007).

Além da enzima pectina liase, a produção de endopoligalacturonase foi por *Colletotrichum lindemuthianum* foi descrita. A enzima está envolvida em processos fisiológicos e patológicos que envolvem a degradação e remodelagem da parede celular vegetal é produzida por vários organismos, como bactérias, fungos filamentosos e plantas. (FEDERICI et al., 2001). A quantidade dessa enzima produzida por *Colletotrichum lindemuthianum* em tecidos infectados foi consideravelmente superior à obtida em meio de cultura. Além disso, a enzima foi

capaz de se difundir na parede celular vegetal e ocasionar a degradação do material pécico das paredes primárias e matrizes da lamela média. (BENHAMOU et al., 1991).

FIGURA 5 – VAGENS DE SOJA (*Glicine max*) AFETADAS POR ANTRACNOSE (*Colletotrichum truncatum*).



FONTE: HENNING et al.(2005) (Imagens de J.T. Yorinori).

A secreção de proteínas destrutivas na fase de transição entre biotrofismo e necrotrofismo e a inibição das defesas vegetais foi observada em *Colletotrichum truncatum*. (Bhadauria et al., 2011). Ainda nessa espécie, também foram identificadas, em níveis variáveis, enzimas pectinolíticas que podem estar associadas aos diversos graus de virulência mostrados por esses patógenos. (RAMOS et al., 2010).

Embora com mecanismos de infecção e sintomas semelhantes, está descrita na literatura a presença de variações morfológicas (PHOTITA et al., 2005) e elevada variabilidade patogênica. (BALARDIN; JAROSZ; KELLY, 1997; BIGIRIMANA; HÖFTE, 2001; DAMASCENO E SILVA; DE SOUZA; ISHIKAWA, 2007) em micro-organismos da mesma espécie.

2.4.3 Métodos de controle para antracnose

As estratégias mais comuns para controle da antracnose são: a rotação de culturas e a utilização de fungicidas. (BASAVARAJU et al., 2009).

Em soja são indicados para controle, além da rotação de culturas, o uso de sementes saudáveis, maior espaçamento entre as linhas; tratamento das sementes e manejo adequado do solo (HENNING et al., 2005; ALMEIDA et al., 2005; EMBRAPA, 2013).

A dificuldade do controle da doença por meio da utilização de práticas culturais se deve à capacidade dos patógenos de sobreviverem por longos períodos em restos vegetais, sementes contaminadas e na forma de conídios no próprio ambiente. (RAVA; SARTORATO, 1994).

As limitações se devem especialmente ao constante transporte de conídios pelo vento, aos problemas ambientais e de custo gerados pela utilização de fungicidas. (BASAVARAJU et al., 2009). A utilização de cultivares resistentes foi descrita pelos autores como um dos métodos mais efetivos para controle da doença.

Porém, apesar da eficiência descrita para a resistência vegetal, a presença de várias linhagens de *Colletotrichum lindemuthianum* evidencia que a transferência de genes que conferem resistência a plantas pode não ser totalmente eficaz, contribuindo para o difícil manejo da antracnose. (BALARDIN; JAROSZ; KELLY, 1997). Da mesma maneira, a presença de várias linhagens também foi relatada para a espécie *Colletotrichum truncatum*. (SANT'ANNA et al., 2010).

Desta forma, o controle químico vem sendo utilizado. O emprego de fungicidas está descrito desde a década de 80, quando Bashir et al. (1985) relataram o controle adequado da antracnose no feijão, causada por *Colletotrichum lindemuthianum*.

Porém, a insensibilidade ao fungicida sistêmico tiofanato metílico foi relatada por Sartorato (2006) em *Colletotrichum lindemuthianum*. O mesmo fungicida, quando aplicado em tratamento de sementes de soja atingidas por *Colletotrichum truncatum*, mostrou eficiência reduzida quando comparado às associações fludioxonil+mefenoxan e tiabendazol+thiram. (PEREIRA et al., 2009). Para *Colletotrichum lindemuthianum*, foi verificado em Orinto, Canadá, que o nível de severidade da antracnose do feijão aliado a condições ambientais favoráveis durante o desenvolvimento vegetal são fatores de elevada influência na eficiência de tratamentos com fungicidas. (GILLARD; RANATUNGA, 2013).

Recentemente, Torres-Calzada et al. (2015) evidenciaram a resistência de *Colletotrichum truncatum* a fungicidas da classe dos benzimidazóis e ressaltaram a

necessidade do monitoramento da sensibilidade dos micro-organismos aos fungicidas empregados para o estabelecimento de protocolos de controle da doença.

Além da resistência do micro-organismo descrita para fungicidas, o custo relacionado a esses produtos químicos no Brasil é elevado. Embora tenha sido descrita uma redução de 21,6% no custo com defensivos agrícolas – que incluem os fungicidas – no ano de 2015 em relação ao ano anterior, ainda foram gastos 9,6 bilhões de dólares com esses produtos. Especificamente em relação aos fungicidas, foram gastos no Brasil 2,9 bilhões de dólares no ano de 2015. (SINDIVEG, 2016).

Aliado ao alto custo do controle químico, porém não menos significativo, o emprego dos produtos químicos reflete negativamente na saúde pública e no meio ambiente. Soares (2010) relaciona que custos adicionais são atribuídos aos efeitos negativos observados no âmbito da saúde pública, sendo a redução na perda produtiva apenas uma pequena porção a ser considerada na análise do custo-benefício para o uso dos fungicidas. De acordo com dados obtidos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), entre 2007 e 2011, houve um aumento de 67,4% de novos casos de acidentes de trabalho não fatais com agrotóxicos e o coeficiente de intoxicações apontou um aumento de 126%. (UFBA, 2012). Nesse sentido, Rigotto, Vasconcelos e Rocha (2014) indicaram uma preocupação crescente com a promoção da saúde em relação ao uso de fungicidas no Brasil.

O emprego de agrotóxicos causa prejuízos ao meio ambiente e à saúde pública. No Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, constam compostos específicos para o tratamento da antracnose. Para a doença em feijão, causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, são indicados 115 produtos para o tratamento vegetal. Já para a antracnose da soja, causada por *Colletotrichum truncatum*, estão descritos 48 produtos. (BRASIL, 2016b).

A Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992, que dispõe sobre as diretrizes e exigências referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins, classifica os compostos de acordo com a toxicidade em quatro classes:

- Classe I - Produtos Extremamente Tóxicos;
- Classe II - Produtos Altamente Tóxicos;
- Classe III - Produtos Medianamente Tóxicos;

– Classe IV - Produtos Pouco Tóxicos.

A toxicidade é avaliada por meio de testes de toxicidade aguda e crônica, determinação de sensibilidade cutânea e ocular, efeitos mutagênicos, teratogênicos, neurotóxicos. (BRASIL, 1992).

Em relação ao meio ambiente, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA), através da Portaria n° 84, de 15 de outubro de 1996, baseando-se nos parâmetros bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico, carcinogênico, classifica os agrotóxicos em quatro classes, sendo aqueles classificados no nível I como altamente tóxicos, classe II: muito perigosos, classe III: perigosos e classe IV: pouco perigosos. (IBAMA, 1996).

De todos os produtos indicados para o controle da antracnose em feijão (115 produtos), apenas aproximadamente 10% (12 produtos) são considerados pouco tóxicos (classe IV). Dentre esses, nenhum é considerado pouco perigoso ao meio ambiente. Já para a soja, apenas dois compostos (aproximadamente 4%) são classificados como pouco tóxicos, porém ambos são perigosos ao meio ambiente. (BRASIL, 2016b).

Os graves prejuízos ambientais e à saúde aliados à dificuldade do controle da antracnose tornam necessária a busca e o desenvolvimento de métodos alternativos como ferramentas auxiliares na contenção da antracnose. Dentre essas, pode ser considerada a IFD.

2.5 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

2.5.1 Definição e aplicações

Um processo fotodinâmico se relaciona à utilização da combinação de um fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular com o objetivo de ocasionar destruição seletiva de um alvo biológico (OCHSNER, 1997). Tais alvos biológicos podem estar relacionados aos seres humanos, como células tumorais (OCHSNER, 1997; BONNETT; MARTÍNEZ, 2001) ou infecções localizadas provocadas por micro-organismos. (PERUSSI, 2007). Nesse caso, o processo é denominado Terapia Fotodinâmica. Quando os alvos são micro-organismos ou estruturas específicas

desses, o processo é denominado Inativação Fotodinâmica (IFD). (GAD et al., 2004).

A IFD foi inicialmente descrita em 1900, quando Raab observou a morte do protozoário *Paramecium caudatum* após exposição à luz na presença do corante laranja de acridina. (RAAB, 1900¹, citado por WAINWRIGHT, 1998; LUKSIENE; PECIULYTE; LUGAUSKAS, 2004; PERUSSI, 2007). Desde então, estudos têm buscado avaliar tais processos inativadores e seu mecanismo de inativação. (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005).

A IFD pode ser empregada para a destruição de vários tipos de micro-organismos, incluindo bactérias (REDDI et al., 2002; ALVES et al., 2009 e MENG et al., 2015; SIMÕES et al., 2016; RAHIMI; FAYYAZ; RASSA, 2016), vírus (COSTA et al., 2011; COSTA et al., 2012), fungos (CARRÉ et al., 1999; FRIEDBERG et al., 2001; LUKSIENE et al., 2004; PERUSSI, 2007) e parasitas (JORI; BROWN, 2004). Também foi descrita a efetividade do processo fotodinâmico para bactérias Gram positivas (*Enterococcus faecalis*) e Gram negativas (*Escherichia coli*). (ALVES et al., 2009). Na década de 1970, Felber et al. (1973) já descreveram melhora significativa nos sintomas da infecção pelo vírus herpes simplex quando expostos a um corante fotossensibilizador e à luz visível. Outros estudos evidenciaram a inativação fotodinâmica de parasitas importantes, como *Plasmodium falciparum* (GRELLIER, 1997) *Acanthamoeba palestinensis* (KASSAB et al., 2003) e *Leishmania amazonenses*. (PELOI et al., 2011).

De acordo com Calzavara-Pinton, Venturini e Sala (2005), fungos filamentosos e leveduras podem ser inativados *in vitro* a partir da utilização de fotossensibilizadores. Neste contexto, foram realizadas avaliações da IFD em leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (CARRÉ et al., 1999) e *Candida albicans* (LAMBRECHTS; AALDERS; VAN MARLE, 2005; CORMICK et al., 2009) ou fungos filamentosos, como *Aspergillus fumigatus* (FRIEDBERG et al., 2001) e micromicetos (LUKSIENE; PECIULYTE; LUGAUSKAS, 2004). Em relação a fungos fitopatogênicos, a IFD *in vitro* foi mensurada em *Colletotrichum acutatum* (MENEZES et al., 2014a) e *Colletotrichum gloeosporioides* (MENEZES et al., 2014b).

A IFD também pode ser empregada para descontaminação de ambientes (JORI; BROWN, 2004), purificação de água para consumo humano (PERUSSI,

¹RAAB, O. Z. Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien. **ZeitschriftBiologie** n. 39, p.524-46, 1900.

2007) e higienização de alimentos (LUKSIENE; PECIULYTE; LUGAUSKAS, 2004), além de ser uma opção o seu emprego em esterilização de produtos derivados de sangue (JORI; BROWN, 2004).

2.5.2 Componentes e processo de destruição celular

São descritos três componentes específicos no processo fotodinâmico: a utilização de luz visível, concentrações intracelulares de compostos químicos denominados fotossensibilizadores e oxigênio (considerado o reagente). (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008). A combinação dos dois componentes completamente atóxicos (luz e os fotossensibilizadores) em um ambiente contendo oxigênio promove a destruição total das células nas quais os fotossensibilizadores se acumulam. (LUKSIENE, PECIULYTE, LUGAUSKAS, 2004).

A fonte luminosa a ser utilizada pode variar, como por exemplo, lâmpadas de argônio, que emitem em comprimento de onda de 488-514 nm. É importante ressaltar que são utilizadas lâmpadas de baixa potência no processo de IFD, uma vez que a inativação dos micro-organismos já ocorre em potências da ordem de miliwatts. Além disso, em termos de morte celular, uma iluminação de elevada potência associada a um curto período de tempo pode demonstrar resultados distintos daqueles obtidos por meio de uma iluminação de baixa potência processada por um período mais longo (WAINWRIGHT, 1998), inferindo que, além da potência luminosa, o tempo de irradiação representa uma variável importante no processo da IFD.

De forma ideal, um fotossensibilizador deve ser promovido ao seu estado excitado através da radiação utilizada; deve estar presente em concentração suficiente para que absorva maior quantidade de fótons que os outros reagentes e a energia do estado tripleto do fotossensibilizador deve ser mais elevada em relação àquela dos demais reagentes. (CAREY; SUNDBERG, 2007).

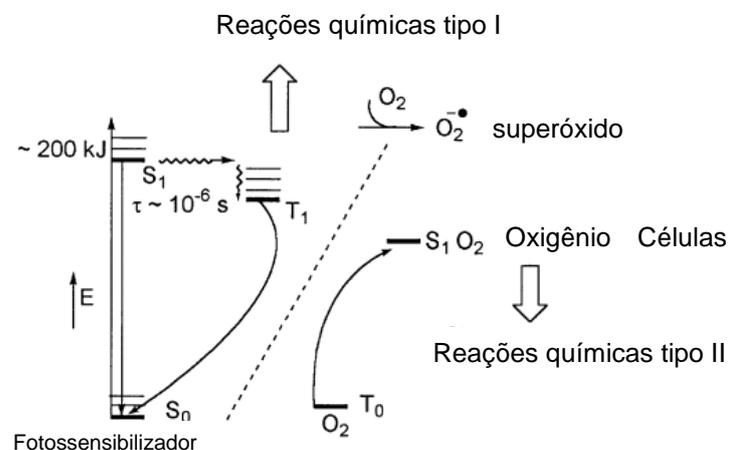
O efeito fotodinâmico é dependente de vários fatores físicos e químicos, como pico e intensidade de absorção e rendimento de oxigênio singleto. Também, outros fatores determinantes para a efetividade do processo correspondem ao coeficiente de partição óleo-água, grau de ionização e presença de grupos carregados, pois esses interferem com a internalização do fotossensibilizador e o

padrão de distribuição entre os compartimentos celulares. (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005). Além disso, segundo Engelmann (2006), a ligação à membrana celular consiste em um importante aspecto a ser considerado na avaliação da efetividade da IFD e seu estudo está diretamente relacionado à estrutura química do composto utilizado.

Após a interação dos compostos com a luz, ocorre a absorção de um fóton, processo denominado sensibilização. Dessa maneira, a molécula do sensibilizador é promovida do estado fundamental (S_0) a um estado excitado, denominado estado singlete (S_1), que apresenta vida curta. O fotossensibilizador pode retornar ao seu estado fundamental emitindo fluorescência ou ser convertido à sua forma triplete (T_1) através de conversão interna, sendo a diferença de energia entre os estados perdida na forma de calor. (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008; JORI et al., 2011).

As mudanças nos estados eletrônicos nos compostos podem seguir dois tipos distintos de reações em organismos. (FIGURA 6).

FIGURA 6 – DIAGRAMA MODIFICADO DE JABLONSKI DEMONSTRANDO OS MECANISMOS DE REAÇÕES ENVOLVIDOS NA IFD



FONTE: traduzido de BONNETT; MARTÍNEZ (2001)

Nas reações tipo I ocorre transferência de elétrons entre o fotossensibilizador no estado triplete e substratos próximos, ou seja, as macromoléculas intracelulares. Há a geração de radicais que são interceptados pelo oxigênio molecular resultando em radicais oxidados. (JORI et al., 2011).

Já nas reações do tipo II verifica-se a transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete para a molécula aceptora (3O_2), culminando na geração do 1O_2 (BONNETT; MARTÍNEZ, 2001; DONNELLY; MCCARRON;

TUNNEY, 2008), uma espécie oxidante cujas atividades antibacteriana, citostática, antiviral e antitrombótica foram demonstradas por Stief (2003).

A produção dessa espécie reativa foi relacionada em vegetais por Lazzaro et al. (2004). Os autores avaliaram a geração de oxigênio singlete a partir de um estudo fotosférico e fotobiológico de fitoalexinas fenilfenalenonas presentes em tecidos vegetais infectados assim como de fenilfenalenonas obtidas via síntese química. A partir da presença de iluminação foi verificado o efeito fotodinâmico *in vitro* resultando na inativação do fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Os rendimentos de oxigênio singlete observados sugerem a intermediação dessa espécie reativa na IFD desse micro-organismo.

A partir da necessidade da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), na ausência desse gás o processo não ocorre. Um procedimento de inativação com presença de luz e fotossensibilizador em atmosfera saturada de argônio não ocasionou destruição de *Saccharomyces cerevisiae* (MATSUMOTO et al., 2011), comprovando a ineficiência do processo na ausência de um dos três componentes da IFD.

As EROs geradas interagem com biomoléculas, sendo o ataque oxidativo de natureza eletrofílica e direcionado para moléculas específicas. (OCHSNER, 1997). Dentre essas se destacam aminoácidos com cadeia lateral aromática ou heterocíclica ou aqueles com átomos de enxofre em sua estrutura; bases nitrogenadas pirimidinas e purinas de RNA/DNA, especialmente a guanosina e lipídios insaturados. (JORI et al., 2011). Segundo os autores, as células microbianas são diferenciadas em aspectos como tamanho e composição bioquímica, sua resposta a um processo fotodinâmico é variável para os diferentes tipos de micro-organismos.

O efeito fotoinativador foi relacionado a um rápido dano ao sistema energético em *Staphylococcus aureus*, induzido pela inibição da cadeia respiratória, resultando na dissipação do potencial de membrana e consequente morte celular. (KOMAGOE et al., 2011).

No ano de 2013, Alves et al. avaliaram os efeitos da inativação fotodinâmica no DNA de bactérias e observaram que a redução no material genético dos micro-organismos é variável de acordo com o fotossensibilizador utilizado e a própria fisiologia bacteriana, e que essas alterações ocorrem em paralelo ao processo de inativação.

Uma interação elevada com lipídios, aminoácidos e DNA, especialmente nas reações desencadeadas através do mecanismo do tipo II foi relacionada na IFD. (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Geralmente, os fotossensibilizadores relatados como altamente eficientes na inativação microbiana se localizam preferencialmente ao nível da membrana plasmática (OCHSNER, 1997; JORI et al., 2011). Em bactérias, essa organela, juntamente com proteínas ligadas à membrana plasmática e enzimas citossólicas, foram relacionadas como sendo os alvos da IFD durante o início da iluminação. (AWAD et al., 2016).

Por sua vez, o material genético é afetado apenas nas etapas posteriores do processo de fotoinativação, sugerindo que tais fotodanos não se relacionam diretamente à morte celular. (WAINWRIGHT, 1998; JORI, 2006).

Alguns sítios de ação e mecanismos de interação que ocorrem em células microbianas após a IFD foram descritos por (WAINWRIGHT, 1998). Dentre esses estão especialmente relacionados os componentes da cadeia respiratória, parede celular, lipídios de membrana, peptídeos e resíduos de ácidos nucleicos. As consequências descritas pelo autor estão relacionadas diretamente aos processos oxidativos e incluem inativação enzimática e formação de hidroperóxidos.

Em 2011, Jori et al. relacionaram os efeitos da IFD em células microbianas como sendo funcionais ou morfológicos. Os primeiros correspondem à inibição de atividade enzimática, formação de “cross-links” na membrana citoplasmática e inibição de processos metabólicos. Os segundos são representados pelas alterações na estrutura dos mesossomos e na cromatina. Ambos contribuem para a atividade fotodinâmica inativadora, inibindo a fisiologia microbiana e facilitando a interação do fotossensibilizador com as células.

2.6 PORFIRINAS COMO FOTOSSENSIBILIZADORES

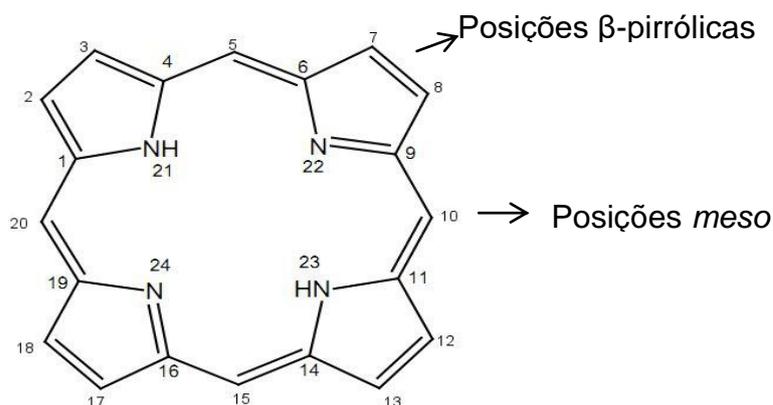
2.6.1 Características estruturais e químicas

A palavra porfirina é proveniente do termo *porphura*, utilizado na Grécia Antiga como designação da cor púrpura. Esses compostos são pigmentos fortemente corados e apresentam a cor a qual se referem em sua denominação. (MILGROM, 1997).

As porfirinas são compostos macrocíclicos que apresentam em sua estrutura básica quatro anéis pirróis ligados através de ligações metínicas (FIGURA 7). O macrociclo porfirínico contém vinte e dois elétrons π , porém, somente dezoito deles contribuem para o caráter aromático do macrociclo. Os demais apresentam caráter de dupla ligação. (MILGROM, 1997).

A característica aromática do macrociclo é comprovada por algumas propriedades, como: elevado calor de combustão, estrutura planar e participação em reações de substituição eletrofílica, características de compostos aromáticos. Porém, a diferença existente entre o benzeno, por exemplo, e o macrociclo consiste nas características das distintas posições do macrociclo que apresentam reatividade variável: posições *meso* e posições β -pirrónicas. O grau de reatividade irá depender da deslocalização da densidade eletrônica do macrociclo. (MILGROM, 1997).

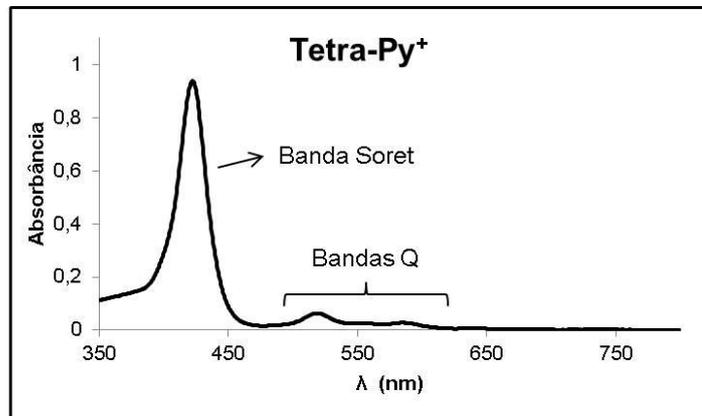
FIGURA 7 – ESTRUTURA BÁSICA DO MACROCICLO PORFIRÍNICO



FONTE: Adaptado de ČEKLOVSKÝ (2009)

O espectro de absorção das porfirinas apresenta dois tipos de bandas, localizadas nas regiões 400-450 nm (banda Soret) e 500-650 nm (bandas Q). A banda Soret apresenta maior intensidade e está situada na região de 390-425 nm, sendo a localização altamente influenciada pela posição de substituição do macrociclo. Por sua vez, o número e intensidade das bandas Q e seus componentes podem indicar se a porfirina apresenta substituição ou não e se há a presença de um metal no interior do macrociclo. (GOUTERMAN, 1961; GOUTERMAN; WAGNIÈRE; SNYDER, 1963). Um exemplo pode ser observado no espectro de absorção ultravioleta-visível (UV-Vis) da porfirina catiônica Tetra-Py⁺ (FIGURA 8).

FIGURA 8 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA PORFIRINA TETRA-PY⁺ COM INDICAÇÃO DA BANDA SORET E DAS BANDAS Q.



FONTE: Adaptado de VANDRESEN (2013)

As porfirinas normalmente são insolúveis em água, porém, a inserção de substituintes (aniônico ou catiônico) em suas diferentes posições (*meso* ou β -pirrólicas) proporcionam variações significativas na solubilidade desses compostos. (ČEKLOVSKÝ, 2009).

2.6.2 Porfirinas e fotossensibilização

Dentre os agentes fotossensibilizadores utilizados para a IFD se encontram as porfirinas. (WAINWRIGHT, 1998; PERUSSI, 2007; DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008). De acordo com Bonnett e Martínez (2001), um composto químico fotossensibilizador, para ser considerado adequado, normalmente apresenta estrutura planar, rígida e com elevado grau de conjugação, que é o caso das porfirinas.

Para serem adequados fotossensibilizadores, os compostos devem demonstrar alta afinidade por diversas classes de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras, fungos filamentosos e protozoários, e alta permeabilidade na membrana citoplasmática e parede celular microbiana. (JORI et al., 2011). Nesse aspecto modificações moleculares em porfirinas vêm sendo avaliadas em diversos estudos.

Alterações estruturais podem ser realizadas pela inserção de substituintes que podem afetar apreciavelmente a cinética e a extensão da ligação com as células dos micro-organismos. O parâmetro principal a ser avaliado consiste no grau de

hidrofobicidade da molécula, que pode ser modulado pelo número de grupos catiônicos presentes ou por meio da inserção de cadeias carbônicas de diferentes comprimentos nos átomos de nitrogênio envolvidos na cationização. (JORI et al., 2006).

Considerando esse parâmetro, Engelmann et al. (2007) testaram um novo método para avaliação do coeficiente de partição óleo/água e correlacionaram a derivados porfirínicos cationizados e, para tal aspecto foi observado um efeito significativo da estereoquímica e natureza dos substituintes carregados positivamente presentes no fotossensibilizador. As porfirinas podem ser cationizadas pela adição de substituintes carregados positivamente nas posições periféricas do macrociclo tetrapirrólico (JORI et al., 2006).

Um fotossensibilizador carregado positivamente (catiônico) se liga rapidamente aos micro-organismos, sendo lentamente capturado pelas células hospedeiras, o que permite seletividade. (PERUSSI, 2007). Dessa maneira, os derivados porfirínicos catiônicos apresentam propriedades fotossensibilizadoras importantes e têm sido avaliados para o tratamento e controle de micro-organismos por meio da IFD (CAMINOS; DURANTINI, 2008).

Inserções de grupos carregados positivamente nas posições β no núcleo porfirínico apresentam efeito significativo na afinidade de ligação das porfirinas com o DNA, sendo que o aumento na quantidade de cargas positivas substituintes reforça a interação com a macromolécula. (CHEN et al., 2006).

Em IFD realizada com bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, porfirinas catiônicas demonstraram inativação significativa quando comparadas a um composto aniônico da mesma classe, que não demonstrou atividade quando submetido ao mesmo período e intensidade de irradiação e foi aplicado como controle negativo. (KOMAGOE et al., 2011).

A utilização de fotossensibilizadores imobilizados em diferentes suportes como agentes antimicrobianos na IFD foi descrita recentemente por Spagnul, Tunner e Boyle (2015). Outro estudo evidenciou que derivados porfirínicos carregados positivamente foram imobilizados em celulose e sua atividade fotodinâmica inativadora foi avaliada frente à *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Os resultados de IFD observados para esses micro-organismos foram satisfatórios, atingindo níveis totais dependendo da porfirina utilizada, concentração e tempo de irradiação. (RAHIMI; FAYYAZ; RASSA, 2016).

A atividade fotodinâmica inativadora desses compostos em relação a fungos filamentosos e leveduras também foi avaliada *in vitro*. (CARRÉ et al, 1999; FRIEDBERG et al., 2001; LAMBRECHTS; AALDERS; VAN MARLE, 2005; CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005; CORMICK et al., 2009) e os resultados obtidos se apresentaram satisfatórios, especialmente quando há presença de cargas positivas na estrutura. (CORMICK et al., 2009).

A atividade fotoinativadora de derivados porfirínicos catiônicos sobre conídios do fungo *Penicillium chrysogenum* foi avaliada por Gomes et al. (2011). Os resultados obtidos evidenciaram distintas eficiências dos derivados como fotossensibilizadores na inativação do micro-organismo. Essas diferenças se relacionaram diretamente à variação de substituintes na posição *meso* dos compostos, que remetem a alterações nas propriedades fotofísicas e, conseqüentemente, em suas capacidades fotoinativadoras.

Os processos de sensibilização que envolvem porfirinas como fotossensibilizadores ocorrem via reações do tipo II, sendo o oxigênio singlete gerado o principal responsável pelos efeitos fotodinâmicos inativadores. (WAINWRIGHT, 1998; JORI; BROWN, 2004).

2.2.3 Porfirinas catiônicas e Inativação Fotodinâmica de fitopatógenos

São evidenciados poucos estudos na literatura aplicando IFD com porfirinas como fotossensibilizadores. A Protoporfirina IX, que não apresenta cargas positivas em sua estrutura, foi avaliada *in vitro* por Vorobey e Pinchuk (2008) em conídios de *Fusarium* spp., fungos filamentosos que são capazes de causar doenças em plantas. Os autores relataram que a foto-oxidação dos componentes celulares resultou em alterações na permeabilidade da membrana e supressão da germinação dos esporos em meio de cultura.

Considerando a eficiência da IFD empregando porfirinas catiônicas como fotossensibilizadores frente à ampla gama de micro-organismos descrita anteriormente, Vandresen et al. (2016) avaliaram a efetividade do processo frente a conídios de *Colletotrichum graminicola*, fungo filamentoso causador da antracnose em milho (*Zea mays* L.).

Foram testados cinco derivados porfirínicos estruturalmente relacionados (FIGURA 9, p. 42) aplicando como variáveis a fluência e a concentração de fotossensibilizadores.

Os resultados demonstrados pelos autores indicaram inativação significativa de conídios do micro-organismo. Para os diferentes derivados foram observadas eficiências fotodinâmicas distintas, sendo aqueles mais eficientes: Di-*trans*-Py⁺ e Tri-Py⁺, para os quais a inativação significativa de conídios de *Colletotrichum graminicola* ocorreu em fluência e concentrações de porfirinas reduzidas (30 J.cm⁻² e 5,0 μmol.L⁻¹, respectivamente).

Aliados aos resultados da IFD, os autores determinaram as propriedades fotofísicas das porfirinas, que estão relacionadas à fotoestabilidade e à capacidade de geração de oxigênio singlete.

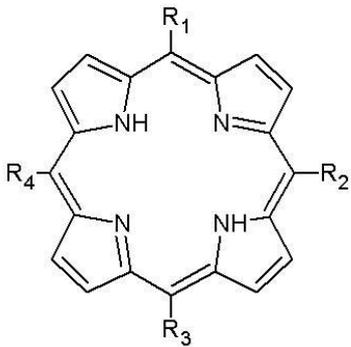
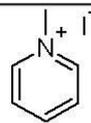
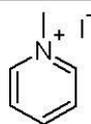
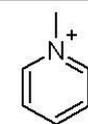
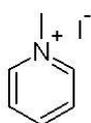
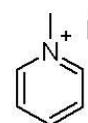
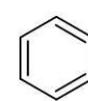
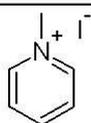
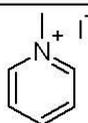
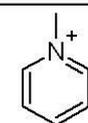
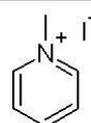
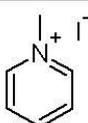
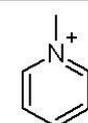
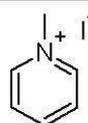
Após a interação com a radiação ultravioleta, algumas porfirinas podem sofrer modificações de suas propriedades fotoquímicas. Segundo Braslavsky (2007, p. 309), esse fenômeno pode ser denominado *bleaching* e, “em fotoquímica, corresponde à perda da intensidade da absorção ou emissão”.

Para avaliar a estabilidade das porfirinas foi realizada uma análise comparativa relacionada à porcentagem de absorção da banda Soret (FIGURA 8, p. 38), no comprimento de onda de sua maior absorção, inicialmente e após a iluminação (GOMES et al., 2011; VANDRESEN et al., 2016).

A fotoestabilidade das porfirinas Mono-Py⁺, Di-*trans*-Py⁺, Di-*cis*-Py⁺, Tri-Py⁺ e Tetra-Py⁺ foi expressa em relação à porcentagem de absorção da banda Soret de cada derivado porfirínico após o período de iluminação. (TABELA 1, p. 41).

Apesar da porfirina Mono-Py⁺ mostrar estabilidade inferior quando exposta à iluminação (88% da absorbância inicial da banda Soret), todos os derivados porfirínicos foram considerados fotoestáveis, ou seja, capazes de manter suas propriedades fotossensibilizantes quando irradiados.

FIGURA 9 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS AVALIADOS POR VANDRESEN ET AL. (2016)

Núcleo porfirínico					
					
Porfirina	Nomenclatura	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Mono-Py⁺	Iodeto de 10,15,20-trifenil-5 (<i>N</i> -metilpiridino-4-il)porfirina				
Di-trans-Py⁺	Iodeto de 10,20-difenil-5,15 (<i>N</i> -metilpiridino-4-il)porfirina				
Di-cis-Py⁺	Iodeto de 15,20-difenil-5,10 (<i>N</i> -metilpiridino-4-il)porfirina				
Tri-Py⁺	Iodeto de 20-fenil-5,10,15 (<i>N</i> -metilpiridino-4-il)porfirina				
Tetra-Py⁺	Iodeto de 5,10,15,20 (<i>N</i> -metilpiridino-4-il)porfirina				

FONTE: VANDRESEN (2013)

TABELA 1 – FOTOESTABILIDADE DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS.

Derivado porfirínico	Fotoestabilidade (%)
Mono-Py⁺	88
Di-trans-Py⁺	95
Di-cis-Py⁺	90
Tri-Py⁺	96
Tetra-Py⁺	99

FONTE: Adaptado de Vandresen et al (2016).

NOTA: Os valores relacionados se referem à porcentagem de absorvância da banda Soret dos derivados após o procedimento de iluminação em comparação com a absorvância inicial.

A segunda propriedade fotofísica avaliada pelos autores foi a capacidade das porfirinas em gerar oxigênio singlete. A produção dessa espécie reativa em um processo fotodinâmico é primordial, pois se acredita que seja a principal responsável pela ação fotodinâmica. (WAINWRIGHT, 1998; MAISCH et al., 2004). Donnelly, McCarron e Tunney (2008) evidenciaram que o oxigênio em seu estado singlete representa um agente oxidante inespecífico, o que não suscita defesas celulares, por isso seu efeito danoso se apresenta acentuado.

A capacidade de geração de oxigênio singlete pelos derivados em estudo foi descrita por Vandresen et al. (2016) (TABELA 2).

TABELA 2 - GERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE PELAS PORFIRINAS MONO-PY⁺, DI-TRANS-PY⁺, DI-CIS-PY⁺, TRI-PY⁺; TETRA-PY⁺.

Composto	Decaimento da absorvância do DFiBF ^b (%)
DFiBF	12
Mono-Py ⁺	87
Di-trans-Py ⁺	82
Di-cis-Py ⁺	80
Tri-Py ⁺	88
Tetra-Py ⁺	78

FONTE: Adaptado de VANDRESEN et al. (2016, p. 676).

NOTA: DFiBF: 1,3-difenilisobenzofurano. A geração de oxigênio singlete foi realizada a partir da foto-oxidação do 1,3-difenilisobenzofurano (DFiBF) (50 mmol.L⁻¹; em DMF:H₂O 9:1) a partir de irradiação por um período de 20 minutos com luz branca com filtro para comprimentos de onda inferiores a 540 nm (9,0 mW.cm⁻²) na ausência ou presença de fotossensibilizador (0,5 mmol.L⁻¹). Os valores percentuais indicam o decaimento da absorvância do DFiBF em comparação com a absorvância inicial. Valores maiores refletem maior produção de ¹O₂.

O elevado decaimento na absorvância do 1,3-difenilisobenzofurano (DFiBF) refletiu a geração de oxigênio singlete pelos compostos. Esse composto absorve fortemente na região de 415 nm. No momento da reação com o oxigênio singlete, há geração de um endoperóxido que é transparente, ou seja, não absorve mais nessa região. Por isso, a produção de oxigênio singlete pelos derivados porfirínicos está diretamente relacionada ao decréscimo na absorção do DFiBF (DETTY; MERKEL, 1990; BEVERINA et al., 2005; ARUNKUMAR et al., 2007).

O emprego de fluência reduzida e concentrações menores das porfirinas catiônicas previamente relatadas evidenciaram a eficiência da IFD frente ao fitopatógeno *Colletotrichum graminicola*. As propriedades da fotoestabilidade e a capacidade de geração de oxigênio singlete pelos derivados porfirínicos contribuíram com os resultados satisfatórios obtidos na IFD.

Considerando a eficiência dessa metodologia utilizando porfirinas como fotossensibilizadores, o presente estudo objetivou avaliar e comparar os cinco derivados porfirínicos catiônicos avaliados por Vandresen et al. (2016) em conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum*, assim como determinar os valores da concentração letal 50% (CL50) e Concentração Letal 90% (CL90), com o intuito de verificar a eficiência desses derivados na inativação de fitopatógenos *in vitro* por meio da aplicação da IFD.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos avaliados foram *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum*, causadores da antracnose em feijão e soja, respectivamente.

3.1.1 Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético

A Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra do Patrimônio Genético Brasileiro foi concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) com finalidade de pesquisa científica, sob o nº 010850/2013-9.

A autorização foi necessária, pois sua exigência está descrita na Medida Provisória nº 2186-16, de 23 de agosto de 2001, dentre outras providências, dispõe sobre o acesso ao Patrimônio Genético e conhecimento tradicional associado.

A lei define que fazem parte do patrimônio genético amostras fúngicas que são mantidas em coleções *ex situ* desde que coletados em território nacional. Ainda, é relatada a definição de acesso ao patrimônio genético como: “a obtenção de amostra de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico ou bioprospecção, visando a sua aplicação industrial ou de outra natureza”. (BRASIL, 2001).

Considerando que a pesquisa objetivou o acesso ao patrimônio genético sem o conhecimento tradicional associado, visto que não foram acessados conhecimentos de comunidades locais ou indígenas, e exibiu a finalidade de pesquisa científica, o acesso foi solicitado ao CNPq, órgão credenciado pelo CGEN para esse fim. (BRASIL, 2014).

No ano de 2015, a Medida Provisória nº 2186-16/2001 foi revogada pela lei nº13123, de 20 de maio de 2015, a qual entrou em vigor em 17 de novembro do mesmo ano. A partir dessa data as pesquisas científicas envolvendo o patrimônio genético brasileiro não necessitam mais de autorização para serem realizadas. (BRASIL, 2015; GAENSLY, 2016).

Embora não seja exigida para pesquisas atuais (BRASIL, 2015; GAENSLY, 2016), tendo em vista que a pesquisa com *Colletotrichum lindemuthianum* e

Colletotrichum truncatum foi iniciada no ano de 2013, foi necessária a solicitação da autorização e envio de relatórios de atividades anualmente ao CNPq.

3.1.2 Obtenção de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum*

O fornecimento dos micro-organismos foi realizado a partir de assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) aprovado pela Resolução número 20 do CGEN. (BRASIL, 2006).

O fungo filamentosso *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) foi isolado de feijão proveniente do Brasil e fornecido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), unidade Arroz e Feijão, localizada em Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil.

O micro-organismo *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) foi isolado de soja proveniente da Argentina e fornecido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada em Brasília, Distrito Federal, Brasil. O fornecimento foi realizado mediante Acordo de Transferência de Material publicado no Diário Oficial da União. (BRASIL, 2013).

3.1.3 Meios de cultura e soluções

Para a reativação, crescimento, manutenção de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) foram utilizados os meios de cultura abaixo relacionados.

O meio líquido batata dextrose (Himedia[®]) foi preparado conforme indicado pelo fabricante.

O meio sólido batata dextrose (Biobrás[®]) foi preparado conforme indicado pelo fabricante.

O meio farinha de aveia é constituído pelos seguintes componentes: farinha de aveia 60 g.L⁻¹, agar 15 g.L⁻¹, água destilada, conforme descrito por VANDRESEN et al. (2016).

O meio sólido Sabouraud dextrose (Kasvi[®]) foi preparado conforme indicado pelo fabricante.

Para a pesagem dos componentes dos meios de cultura foi empregada a balança analítica eletrônica Ohaus[®] Adventurer[™].

Para a conservação dos conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) foi preparada uma solução aquosa de leite em pó desnatado (Itambé®) 10% (p/v).

Para o preparo da suspensão de conídios foi utilizada uma solução aquosa de Tween 80 (Synth®) 0,1% (p/v).

O tampão fosfato salina (TFS) é constituído por cloreto de sódio 8,0 g.L⁻¹, fosfato dissódico 1,44 g.L⁻¹, cloreto de potássio 0,2 g.L⁻¹, fosfato monopotássico 0,24 g.L⁻¹, água destilada.

De acordo com a necessidade, o pH dos meios de cultura e soluções foi ajustado utilizando uma solução de ácido sulfúrico 2,0 mol.L⁻¹ ou solução de hidróxido de sódio 1,0 mol.L⁻¹ com o auxílio de potenciômetro WTW® 330i.

A esterilização dos meios de cultura e soluções foi realizada em autoclave vertical Digitale® AV75, empregando calor úmido, à temperatura de 121°C, com pressão de 1 atmosfera, por um período de 15 minutos.

3.1.4 Reativação

Os micro-organismos *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) foram fornecidos pela Embrapa crescidos em placas de Petri. Ambos foram mantidos em refrigeração com temperatura de 4°C (Cônsul®). A reativação dos fungos filamentosos foi realizada em frascos erlenmeyer de 50 mL contendo 10,0 mL de meio líquido Batata Dextrose (Himedia®), os quais foram mantidos em estufa incubadora para B.O.D., a 24°C, durante cinco dias.

3.1.5 Crescimento

O crescimento de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) foi realizado a partir da transferência de “pellets” do micro-organismo do meio líquido de reativação para placas de Petri contendo meio sólido batata dextrose (Biobrás®, pH 5,6).

Para o fungo filamentoso *Colletotrichum truncatum* (ERG 133), os “pellets” presentes no meio líquido de reativação foram transferidos para placas de Petri contendo meio sólido farinha de aveia.

As placas de Petri inoculadas com os micro-organismos foram mantidas a 24°C em estufa incubadora para B.O.D., durante sete dias. Os conídios

formados na superfície dos meios de cultura foram removidos e confirmados quanto à morfologia a partir de microscopia óptica com aumento de 400x.

3.1.6 Preparo da suspensão de conídios

As suspensões de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) foram preparadas a partir da adição de um volume de 0,5 mL de uma solução de Tween 80 0,1% (p/v) em cada placa de Petri contendo os fungos filamentosos crescidos. Após a adição da solução, foi realizada leve raspagem na cultura para obtenção dos conídios seguida da transferência da suspensão e complemento do volume em um balão volumétrico de 25,0 mL. A suspensão foi quantificada na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹ utilizando câmara de contagem (Neubauer[®]) de acordo com metodologia descrita por Tortora, Funke e Case (2012).

3.1.7 Conservação

Os conídios de ambos os micro-organismos foram conservados por meio da utilização de duas técnicas: congelamento e liofilização. O congelamento foi realizado em tubos de polipropileno com capacidade de 1,5 mL. Em cada tubo foi adicionado um volume de 100 µL da suspensão de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) ou *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) previamente quantificada, seguido da adição de 350 µL de uma solução estéril de leite em pó desnatado 10% e 50 µL de glicerol (10% v/v), considerado o agente crioprotetor. Foram preparados vinte tubos para cada micro-organismo. Os tubos foram mantidos em freezer Cònsul, a -20°C.

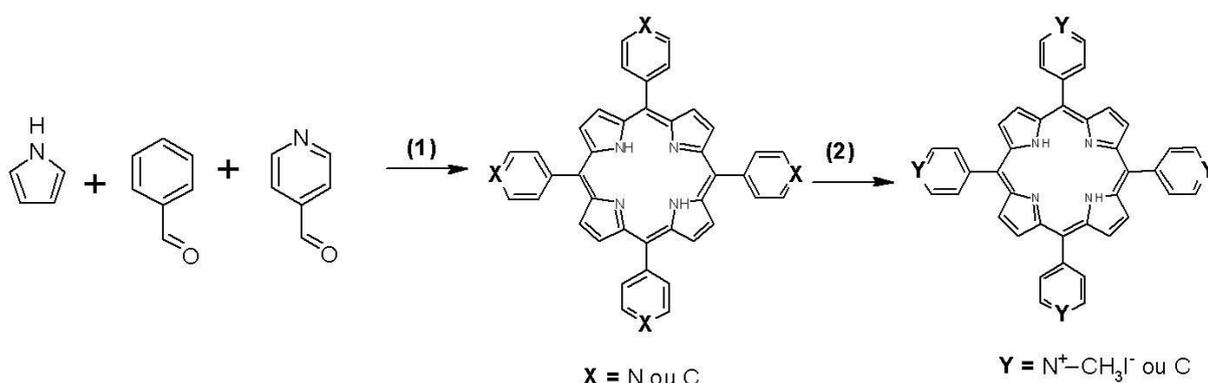
O procedimento da conservação por liofilização também foi realizado em tubos de polipropileno empregando as mesmas etapas iniciais descritas para o congelamento: adição de 100 µL da suspensão quantificada de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) ou *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) seguido da adição de 350 µL de uma solução estéril de leite em pó desnatado 10%. A seguir, os tubos foram mantidos em freezer Cònsul, a -20°C por 24 horas e liofilizados em liofilizador de bancada Operon[®].

3.2 DERIVADOS PORFIRÍNICOS

Os derivados porfirínicos catiônicos *meso* substituídos avaliados foram Mono-Py⁺, Di-*trans*-Py⁺, Di-*cis*-Py⁺, Tri-Py⁺ e Tetra-Py⁺, os quais foram previamente sintetizados nos laboratórios de Síntese de Fármacos (Departamento de Farmácia – UFPR) e Síntese de Heterociclos e Glicoconjugados (Departamento de Bioquímica – UFPR). (VANDRESEN, 2013). (FIGURA 9, p. 42).

A FIGURA 10 representa um esquema da síntese dos derivados porfirínicos catiônicos, os quais foram sintetizados inicialmente em sua forma neutra e cationizados em etapa posterior. (VANDRESEN, 2013; VANDRESEN et al., 2016).

FIGURA 10 – ESQUEMA DAS ETAPAS DE SÍNTESE DAS MESO-TETRA-ARILPORFIRINAS CATIÔNICAS AVALIADAS COMO FOTOSSENSIBILIZADORES



FONTE: Vandresen (2013).

NOTA: (1): ácido propiônico/refluxo, 1h

(2): N,N-dimetilformamida, CH₃I/temperatura ambiente, 15h

3.2.1 Armazenamento e avaliação na IFD

Soluções de concentração 1 mmol.L⁻¹ dos compostos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e acondicionadas a 4°C em frasco âmbar. Para obtenção das concentrações a serem testadas na IFD, as soluções iniciais de porfirinas foram adicionadas no meio de análise em volumes calculados de acordo com a seguinte equação:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

Onde:

C_i = concentração inicial do derivado porfirínico ($1000 \mu\text{mol.L}^{-1} = 1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$)

V_i = volume de solução estoque a ser utilizada (μL);

C_f = concentração de derivado a ser testada ($\mu\text{mol.L}^{-1}$);

V_f = volume final do meio reacional da IFD ($5000 \mu\text{L}$).

As cinco concentrações selecionadas para os diferentes derivados porfirínicos foram variáveis entre os diferentes compostos e em relação aos dois micro-organismos. (TABELA 3).

TABELA 3 – CONCENTRAÇÕES DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS CATIÔNICOS EMPREGADAS NOS ENSAIOS DE INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO* EM *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133).

Porfirina	Concentrações ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) empregadas para <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143)	Concentrações ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) empregadas para <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG133)
Mono-Py⁺	0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,25	0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,25
Di-trans-Py⁺	0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8	0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,6
Di-cis-Py⁺	0,1; 0,15; 0,2; 0,3 e 0,4	0,05; 0,1; 0,15; 0,2 e 0,25
Tri-Py⁺	0,125; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0	0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,25
Tetra-Py⁺	0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0	0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0

FONTE: O autor (2016).

3.3 FONTE LUMINOSA

A incidência de luz foi realizada empregando como fonte luminosa o equipamento Lumacare LC 122A (FIGURA 11), que possui uma fibra óptica (400-800 nm) acoplada a uma lâmpada de quartzo (250W). Para os experimentos de IFD foi estabelecida uma irradiância de 50 mW.cm^{-2} , determinada a partir da distância de 111 mm entre a fibra óptica e cada poço da placa, no qual foi executada cada análise. A fluência foi definida em 90 J.cm^{-2} .

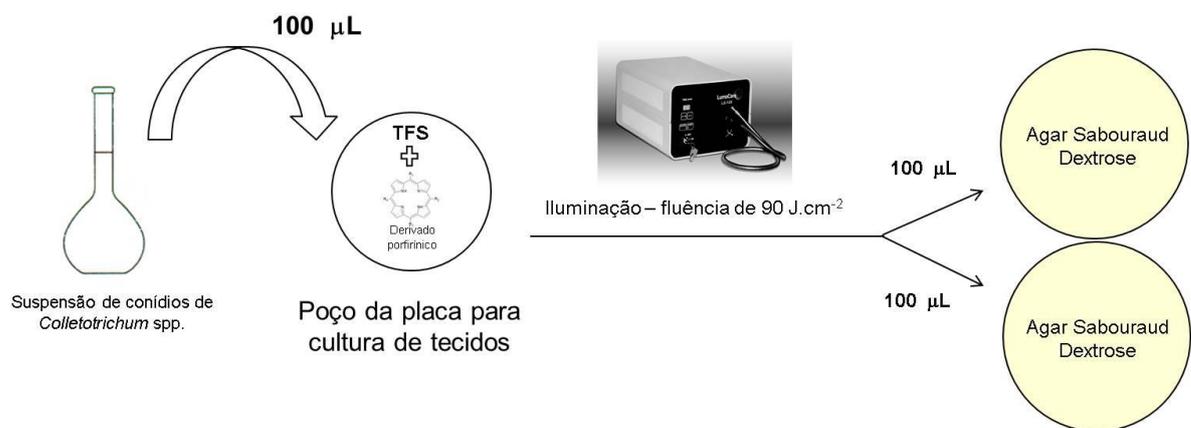
FIGURA 11 – LUMACARE MODELO LC 122A



FONTE: LUMACARE (2016)

3.4 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO*

O procedimento de inativação fotodinâmica foi realizado de acordo com o Vandresen et al. (2016, p. 674).

FIGURA 12 – ESQUEMA DEMONSTRANDO O PROCEDIMENTO DA IFD *IN VITRO*

FONTE: O autor (2016)

NOTA: TFS: Tampão fosfato salina. O volume final presente em cada poço correspondeu a 5,0 mL, sendo fixo o volume adicionado de suspensão de conídios de 100 µL e o volume adicionado de solução 1 mmol.L⁻¹ de cada derivado porfirínico foi determinado de acordo com a concentração final desejada. O TFS consistiu no diluente do meio de análise e foi empregado para completar o volume de 5,0 mL. Para os controles, as análises foram realizadas na ausência de porfirina e luz (Branco, BR), ausência de porfirina (Controle Claro, CC) e ausência de luz (Controle Escuro, CE).

Para os experimentos, foram utilizadas microplacas estéreis para cultura de tecidos contendo seis poços (Kasvi®). Em cada poço da microplaca foi efetuada uma avaliação e, durante os ensaios, foi aplicada agitação magnética (Cientec®).

O volume final estabelecido para cada poço das microplacas para cultura de tecidos foi 5,0 mL, empregando TFS como diluente (GOMES et al., 2011; VANDRESEN et al., 2016). Foram adicionados em cada poço volumes específicos de cada componente: TFS, suspensão de conídios e a porfirina a ser testada. Em relação à suspensão de conídios, foi utilizado o volume de 100 μ L para cada avaliação.

Além disso, foram executados: controle claro (CC), controle escuro (CE) e um tratamento com ausência de luz e derivados porfirínicos, denominado “branco” (BR). O primeiro foi realizado empregando isoladamente luz sobre os conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) em mesma intensidade dos ensaios de IFD. No segundo, foi adicionado, na presença do micro-organismo, concentrações das porfirinas na ausência de irradiação. (TABELA 4). O “branco” foi realizado da mesma maneira, em poço distinto da placa, na ausência de porfirina e luminosidade.

TABELA 4 – CONCENTRAÇÕES DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS CATIÔNICOS EMPREGADAS NOS CONTROLES ESCUROS *IN VITRO* EM *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133).

Porfirina	Concentrações ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) no CE para <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (1143)	Concentrações ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) no CE para <i>Colletotrichum truncatum</i> (ERG133)
Mono-Py⁺	2,0	1,0
Di-trans-Py⁺	0,8	0,8
Di-cis-Py⁺	0,4	0,25
Tri-Py⁺	1,0	1,25
Tetra-Py⁺	2,0	2,0

FONTE: O autor (2016).

NOTA: CE: Controle escuro, que corresponde à adição do fotossensibilizador no meio de análise, na presença de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) na ausência de iluminação (no escuro).

Os resultados da IFD foram avaliados empregando a contagem em placas descrita por Tortora, Funke e Case (2012) a partir da metodologia de espalhamento em placas. Dessa maneira, para *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) de cada avaliação realizada, foi retirado um volume de 100 μ L de cada poço em duplicata. O volume foi distribuído em placas de Petri contendo meio sólido Sabouraud dextrose (Sigma[®], pH 5,6). As placas foram mantidas a 24°C em estufa incubadora para B.O.D., durante quatro dias para *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133). Após

esse período foi realizada a contagem das colônias e conversão para Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC.mL⁻¹). Os resultados foram evidenciados a partir da média das contagens obtidas nas duplicatas dos controles e de cada avaliação da IFD. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4.1 Análise gráfica e estatística

Foram executadas com o auxílio do programa Graphpad Prism 5.0. A análise gráfica foi efetuada empregando gráfico em colunas relacionando testes, “branco”, controle claro, controle escuro com os valores obtidos em UFC.mL⁻¹ e demonstrando o respectivo desvio padrão obtido. A análise estatística foi realizada por meio do teste de Bonferroni, com nível de significância de $p < 0,05$.

3.4.2 Cálculo da Concentração Letal 50% e Concentração Letal 90%

A concentração dos derivados porfirínicos catiônicos letal para 50% (CL50) e 90% dos conídios (CL90) foi calculada a partir de análise gráfica com o auxílio do Programa Microsoft Excel[®]. Foram plotados gráficos em linhas das médias das triplicatas relacionando as cinco diferentes concentrações testadas e o número de UFC.mL⁻¹. A seguir foram obtidos a equação da reta, no formato “ $y=ax+b$ ”, e o quadrado dos coeficientes de correlação (r^2) para a IFD correspondente a cada derivado porfirínico,

Os cálculos foram realizados utilizando como parâmetro os valores em UFC.mL⁻¹ observados para o “Branco”. Esses valores correspondentes a 100% foram multiplicados por 0,5 e 0,1, a fim de serem obtidos os números relacionados ao crescimento de 50% e 10% dos micro-organismos, respectivamente. A seguir os números foram aplicados nas equações da reta correspondentes a cada porfirina, sendo substituído o valor de “y” em cada equação. Os valores de “x” obtidos para (Branco x 0,5) e (Branco x 0,1) corresponderam à CL 50 e CL 90, respectivamente.

3.3 INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE PORFIRINAS CATIÔNICAS E CONÍDIOS DE *Colletotrichum* spp.

3.3.1 Avaliação por espectrofluorimetria

O ensaio de interação entre os derivados porfirínicos e conídios foi realizado segundo metodologia relacionada por Vandresen et al. (2016). Suspensões quantificadas de conídios (10^6 conídios.mL⁻¹) dos fungos filamentosos *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) foram incubadas com os derivados porfirínicos na concentração de 2,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ na ausência de iluminação, a 25°C sobre agitação orbital de 150 rpm (Tecnal[®] TE-421) por 30 minutos. O derivado porfirínico não ligado foi removido após centrifugação da mistura por 5 minutos a 11.000 rpm. Para cada tempo de incubação foram avaliadas duas condições: a primeira com apenas uma centrifugação para remoção do fotossensibilizador não ligado e a segunda com uma lavagem adicional com 1,0 mL de TFS seguida de centrifugação nas mesmas condições. Para ambas as situações, o precipitado foi ressuspensão em 1,0 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol.L⁻¹ por no mínimo, um período de 24 horas, até a observação de uma suspensão de conídios límpida. Essas suspensões foram utilizadas para a avaliação da captação do fotossensibilizador pelos conídios. Os ensaios foram realizados em triplicata. A fluorescência emitida pelos conídios suspensos foi medida em espectrofluorímetro (Shimadzu RF-5301PC, slit 3, Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná). Os comprimentos de onda utilizados para a excitação das moléculas foram os correspondentes à banda Soret de cada fotossensibilizador (TABELA 5).

TABELA 5 –COMPRIMENTOS DE ONDA (nm) EMPREGADOS PARA EXCITAÇÃO DAS PORFIRINAS NO ENSAIO DE INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE FOTOSSENSIBILIZADORES E CONÍDIOS DE *Colletotrichum* spp.

Derivado porfirínico	Comprimento de onda de excitação (nm)
Mono-Py⁺	445
Di-trans-Py⁺	419
Di-cis-Py⁺	421
Tri-Py⁺	422
Tetra-Py⁺	426

FONTE: O autor (2013).

O intervalo de comprimentos de onda para a emissão esteve localizado entre 600 nm e 750 nm, para o qual foi mensurada a área referente à emissão de cada amostra. Uma curva de calibração foi determinada para cada derivado porfirínico solubilizado em NaOH 0,1 mol.L⁻¹ a partir da área de emissão na região entre 600 nm e 750 nm. A divisão dos valores mensurados para as amostras pelo coeficiente angular da equação da reta permitiu a obtenção das quantidades (em micromol) que interagiram com os conídios. Essas foram convertidas a nanomol. Os valores da interação foram determinados por meio da divisão entre a quantidade (em nanomol) do fotossensibilizador nos conídios suspensos pelo número de conídios em suspensão (10⁶ conídios.mL⁻¹). Por sua vez, a relação número de moléculas de fotossensibilizador.célula⁻¹ foi calculada utilizando o número de Avogadro.

3.3.2 Avaliação por microscopia de fluorescência

As suspensões quantificadas (10⁶ conídios.mL⁻¹) de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) foram incubadas com os derivados porfirínicos na concentração de 10,0 μmol.L⁻¹ para Mono-Py⁺, Di-*trans*-Py⁺, Di-*cis*-Py⁺, Tri-Py⁺ e Tetra-Py⁺. As incubações foram realizadas na ausência de iluminação, a 24°C sobre agitação orbital de 150 rpm (Tecna[®] TE-421) por 30 minutos. A seguir, o fotossensibilizador que não interagiu foi removido por meio de centrifugação a 11000 rpm por 5 minutos e, foi realizada uma lavagem do precipitado com 1,0 mL de TFS, seguida de centrifugação em condições idênticas. Posteriormente, foi adicionado um volume de 100 μL de TFS em cada precipitado e esses foram homogeneizados em vórtex. Na sequência, foi realizada a montagem de lâminas em duplicata aplicando 50 μL da suspensão, a qual foi coberta com lamínula de 24x40 mm. A seguir, essas foram seladas nas lâminas utilizando esmalte. As lâminas foram montadas e seladas em ambiente sem iluminação, 24 horas antes da visualização. A avaliação da microscopia foi realizada com microscópio de fluorescência Olympus BX51TF (Setor de Ciências Biológicas – UFPR) empregando avaliação em campo claro e fluorescência a partir de filtro Texas Red (TXRED) em aumentos de quarenta vezes. A obtenção e análise das imagens foi realizada empregando o software Cell[^]F[®], Olympus Europe Software Information, versão 5.0. A interação entre os derivados porfirínicos e os conídios de

Colletotrichum lindemuthianum (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) foi avaliada a partir da comparação entre as imagens obtidas em campo claro e utilizando fluorescência, as quais foram montadas lado a lado com o auxílio do software Fiji Image J.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MICRO-ORGANISMOS

Um crescimento adequado aliado à produção satisfatória de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) foram fundamentais para avaliação da eficiência da IFD nesses fungos filamentosos. Considerando esse aspecto, a definição dos meios de cultura que propiciem o desenvolvimento dos micro-organismos representou a primeira etapa no estabelecimento da IFD.

4.1.1 Cultivo de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133)

Para um desenvolvimento adequado, os fungos exigem preferencialmente carboidratos simples, especialmente D-glucose. Porém, podem ser utilizados outros compostos mais complexos como sacarose, maltose e até mesmo amido (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Além dos carboidratos, que constituem essencialmente fontes de carbono, outros elementos necessários, tais como nitrogênio, oxigênio e os microelementos, devem estar presentes para que um meio de cultura seja considerado adequado para a visualização de colônias. (MENEZES E SILVA et al., 2006).

Inicialmente foi realizada uma busca no *American Type Culture Collection* (ATCC) a fim de verificar o meio de cultura indicado para os fungos filamentosos *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum*. Para ambos estava descrito o meio de cultura batata dextrose (ATCC, 2013), o qual é composto por infusão de batatas 200,0 g.L⁻¹, glucose 20,0 g.L⁻¹, ágar 15 g.L⁻¹ e água destilada em quantidade suficiente. (BD, 2009).

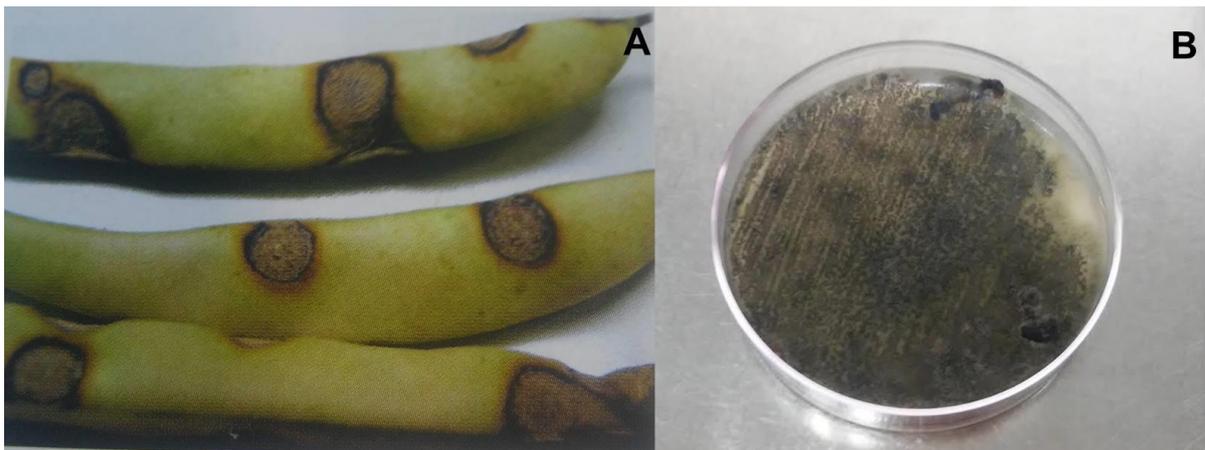
Segundo Becton, Dickinson and Company (2009), o meio sólido batata dextrose é indicado para o crescimento de fungos e leveduras e o amido proveniente da batata, assim como a infusão do vegetal e a dextrose permitem um crescimento pronunciado desses micro-organismos. (BD, 2009).

O meio líquido batata dextrose (pH 5,2) foi aplicado para o crescimento inicial dos micro-organismos. Em relação à composição, a variação reside apenas

no fato do meio de cultura não conter o ágar, que representa o agente solidificante. (BD, 2009). Em um meio líquido, devido ao estado físico, há maior disponibilidade dos nutrientes para os micro-organismos e, em consequência, há um desenvolvimento desses com velocidade superior. A partir do cultivo realizado em meio líquido, os micro-organismos foram semeados em meio sólido batata dextrose (pH 5,6) para a obtenção de um crescimento em superfície de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133).

Após o período de incubação de sete dias empregando temperatura de 24°C, o desenvolvimento de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) foi satisfatório. (FIGURA 13, B).

FIGURA 13 – VAGEM DE FEIJÃO COM SINTOMAS DE ANTRACNOSE (A) E ASPECTO DE *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO BATATA DEXTROSE (B)



FONTE: (A): KIMATI et al. (2005); (B): O autor (2016).

O feijão, hospedeiro de *Colletotrichum lindemuthianum*, demonstra uma composição nutricional representada pela sua maioria em carboidratos. De acordo com dados da Unicamp (2011), o alimento cru (maneira que é afetado pelo micro-organismo), mesmo em diferentes variedades (carioca, fradinho, preto, rosinha, roxo) demonstra elevada porcentagem de carboidratos, em níveis próximos a 60%. As proteínas estão em segundo lugar (em torno de 20%).

No meio de cultura batata dextrose, além da dextrose, que se mostra adequada para o desenvolvimento de fungos, a batata (*Solanum tuberosum* L.) contribui para esse crescimento a partir de sua composição nutricional. De acordo com UNICAMP (2011), no tubérculo cozido é caracterizada a maior quantidade de

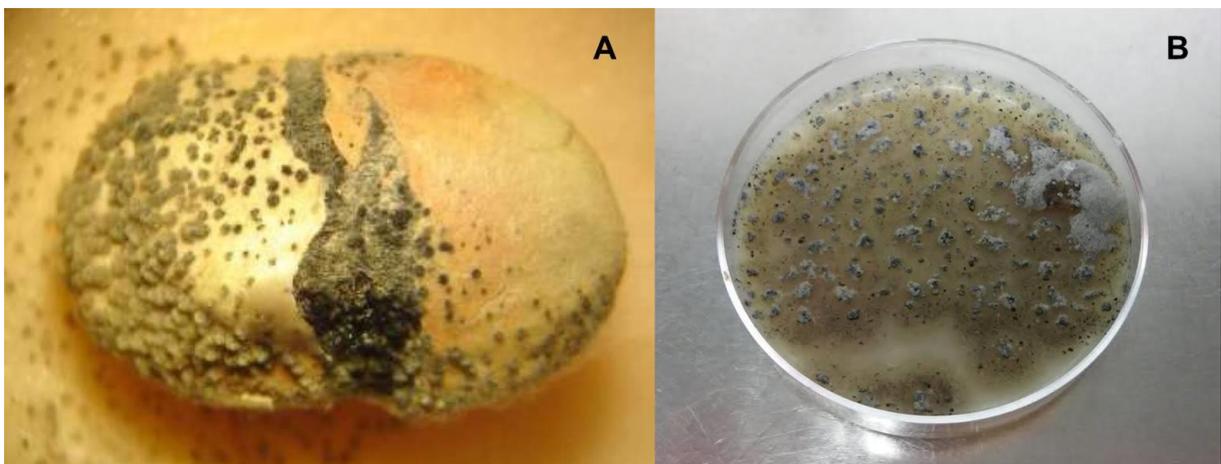
carboidratos (11,9%). Além disso, há a presença de níveis reduzidos de proteínas (1,2%). Além disso, o amido é indicado por Tortora, Funke e Case (2012) como uma fonte de carbono presente em meios de cultura.

O crescimento e conidiogênese de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) em meio batata dextrose foram satisfatórios, visto que o meio de cultura apresenta características nutricionais semelhantes às demonstradas pelo hospedeiro do fungo filamentososo.

A composição nutricional do meio sólido batata dextrose, da mesma maneira que para *Colletotrichum lindemuthianum* (1143), contribuiu para o crescimento de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133). Porém, para o segundo, o desenvolvimento foi evidenciado especialmente pela presença abundante de micélio e reduzida produção de conídios. Por isso, para esse fungo filamentososo, foi avaliado o meio sólido farinha de aveia. O meio foi testado tendo em vista a indicação desse para o “cultivo de fungos, especialmente para a formação de macrosporos”. (BD, 2009, p. 406).

Em *Colletotrichum truncatum* (ERG 133), após a transferência dos “pellets” do meio líquido batata dextrose para o meio sólido farinha de aveia e incubação por sete dias a 24°C, foi observado crescimento na superfície do meio de cultura. (FIGURA 14, B).

FIGURA 14 – GRÃO DE SOJA COM ANTRACNOSE DEMONSTRANDO A PRESENÇA DE COLÔNIAS (A) E *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) EM MEIO SÓLIDO FARINHA DE AVEIA (B).



FONTE: (A): GOULART (2009); (B): O autor (2016).

Assim como o feijão, a soja, vegetal hospedeiro de *Colletotrichum truncatum*, na forma de farinha mostra em sua composição nutricional valores superiores de carboidratos, quantidade próxima a 38% e proteínas em níveis de 36%. (UNICAMP, 2011). Segundo os autores, a farinha de aveia utilizada no meio de cultura apresenta níveis elevados de carboidratos (aproximadamente 60%) e quantidade significativa de proteínas (níveis próximos a 13%). Além disso, há elevada quantidade de fibra alimentar (9,1%).

O meio farinha de aveia é composto basicamente por aveia, já que o único componente adicional, o ágar, consiste apenas no agente solidificante do meio. (BD, 2009). Segundo os autores (BD, 2009, p. 406), o meio de cultura permite o desenvolvimento dos fungos pelo fato da “aveia representar uma fonte de nitrogênio, carbono, proteínas e nutrientes”.

A utilização de meio sólido contendo aveia para cultivo de espécies de *Colletotrichum* spp. está descrita na literatura. Em 1984, Lenné, Sonoda, Parbery (1984) descreveram a produção de conídios por diferentes espécies de *Colletotrichum* spp. e empregaram meio de cultura contendo aveia. Adicionalmente, o cultivo prévio de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio líquido Batata Dextrose seguido da transferência para meio de farinha de aveia diluído (15 a 20% de meio comercial e 1,5% de ágar) foi relatado por Suzaki (2011) como um eficiente método para produção de conídios. Da mesma maneira, meios de cultura contendo aveia promoveram produção expressiva de conídios por *Colletotrichum sublineolum* (ZANETTE; NÓBREGA; MEIRELLES, 2009) *Colletotrichum capsici* (KUMAR, SINGH; GARG, 2015) e *Colletotrichum graminicola*. (VANDRESEN et al., 2016).

Em relação a *Colletotrichum truncatum*, o cultivo do micro-organismo empregando meios de cultura com essa composição também foi relatado por Tullu et al. (2006); Gossen, Anderson e Buchwaldt (2009); Bhadauria et al. (2011); Shivaprakash et al. (2011) e Armstrong-Cho et al. (2012).

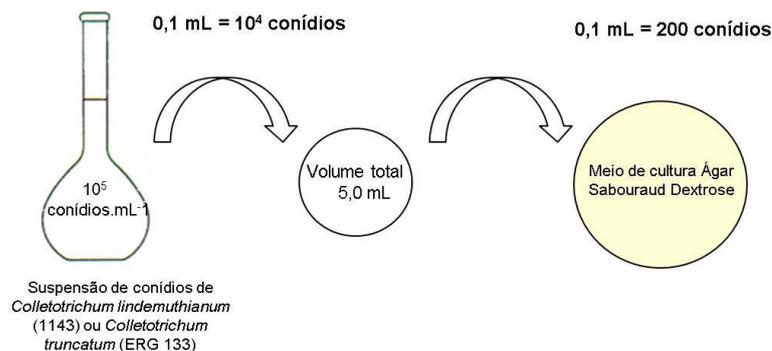
Assim, a obtenção de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) foi satisfatória nos meios batata dextrose e farinha de aveia, respectivamente, sendo possível o emprego dessas estruturas para avaliação na IFD com porfirinas catiônicas.

4.1.2 Contagem em placas após IFD

Para mensurar os efeitos da IFD sobre conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) foi utilizada a contagem em placas a partir do método de espalhamento em placas, no qual um volume de inóculo é adicionado à superfície de um meio de cultura sólido e espalhado com o auxílio de um bastão de vidro em L. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). De acordo com os autores, a contagem permite a determinação do número de células viáveis e, é expressa em número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

De acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA, 2016), o número ideal de colônias presentes para a contagem em placas consiste entre 25 e 250 colônias. Assim, a quantificação das suspensões de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) e posterior aplicação da IFD levaram a uma contagem em placas com um número aproximado de 200 unidades formadoras de colônia (UFC). (FIGURA 15).

FIGURA 15 – ESQUEMA DA ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE CONÍDIOS PARA CONTAGEM EM PLACAS



FONTE: O autor (2016).

A partir da quantificação das suspensões de conídios em câmara de contagem foram estabelecidos os volumes a serem retirados da suspensão e posteriormente do meio de análise (volume final de 5,0 mL) para inoculação em placas, com número estimado de conídios considerado adequado para contagem pelo FDA.

O meio de cultura utilizado para a contagem em placas foi o meio sólido Sabouraud dextrose, que é indicado para o cultivo de fungos patogênicos e não

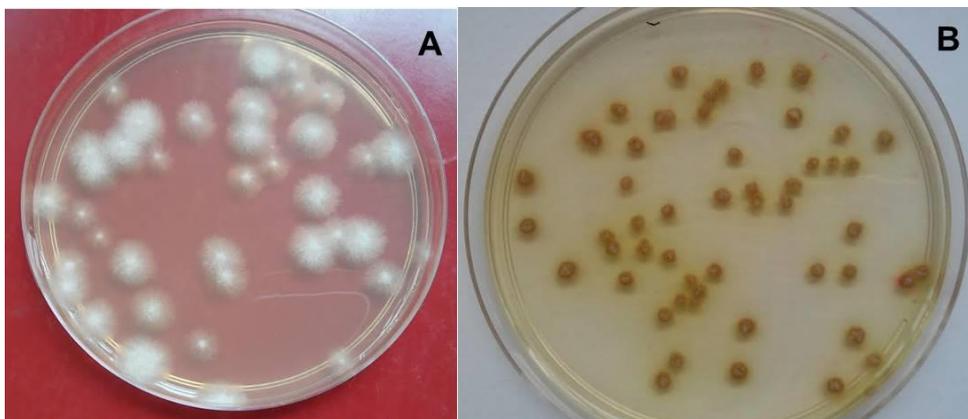
patogênicos. (BD, 2009). O meio é constituído por digestão péptica de tecido animal 40,0 g.L⁻¹; digestão pancreática de caseína 5,0 g.L⁻¹; Ágar 15,0 g.L⁻¹ e água destilada. Esse representa um meio de cultura complexo, onde a composição química não é totalmente definida, já que contém digestão péptica de tecido animal e digestão pancreática de caseína. (TORTORA, FUNKE; CASE, 2012). Segundo os autores, nesses meios as “necessidades de energia, carbono, nitrogênio e enxofre dos micro-organismos são fornecidas essencialmente pelas proteínas”. (TORTORA, FUNKE; CASE, 2012, p. 165).

Especificamente para o meio sólido Sabouraud dextrose, Becton, Dickinson and Company (2009) o relatam como um meio de peptona suplementado com dextrose para contribuir com o crescimento de fungos. Como relatado anteriormente, os fungos exigem normalmente carboidratos simples como dextrose para seu desenvolvimento. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

A FIGURA 16 retrata a aparência das Unidades formadoras de Colônia (UFC) observadas no meio sólido Sabouraud dextrose após incubação em estufa BOD a 24°C durante quatro dias.

A partir dessa metodologia, foi permitida a avaliação dos efeitos da relação aos conídios dos fungos filamentosos, uma vez que, cada conídio originará uma colônia e, quanto maior a redução nas contagens, menor a viabilidade do micro-organismo, que é reflexo da morte celular gerada pela IFD.

FIGURA 16 – COLÔNIAS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) (A) E *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) (B) NO MEIO MEIO SÓLIDO SABOURAUD DEXTROSE.



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Colônias de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) (A) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) (B) após crescimento em estufa BOD, a 24°C durante quatro dias.

4.2 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO*

Os efeitos da IFD empregando as cinco porfirinas em *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) estão sumarizados na TABELA 6. São evidenciados os resultados obtidos para os controles (controle claro, controle escuro e “branco”), expressos em UFC.mL⁻¹; assim como os valores de CL50 e CL90 (μmol.L⁻¹).

O procedimento de IFD demonstra sua atividade apenas quando há associação de luz, fotossensibilizador e oxigênio (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008), portanto, modificações nesses componentes influem diretamente na efetividade do processo. Sendo assim, é fundamental uma análise dos componentes da IFD e de seus parâmetros aplicados para inativação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133).

TABELA 6 – INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO* DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) (Cl) E *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) (Ct): CONTROLES E VALORES DE CL50 e CL90

Porfirinas testadas	Controles (UFC.mL ⁻¹)			IFD (μmol.L ⁻¹)		
		Controle Claro	Branco	Controle Escuro	CL50	CL90
Mono-Py ⁺	Cl	12717	11033	12817	0,62	1,12
	Ct	1015	1241	942	0,41	1,05
Di-trans-Py ⁺	Cl	10800	11033	13616	0,52	0,99
	Ct	1141	1428	1015	0,28	0,53
Di-cis-Py ⁺	Cl	12717	11133	10350	0,24	0,36
	Ct	1163	1498	1131	0,10	0,22
Tri-Py ⁺	Cl	12717	12100	15100	0,58	1,04
	Ct	1867	2203	1641	0,39	1,03
Tetra-Py ⁺	Cl	12717	12100	12683	1,23	2,09
	Ct	1867	2520	1867	0,97	2,45

FONTE: O autor (2016).

NOTA: Cl: *Colletotrichum lindemuthianum* (1143). Ct: *Colletotrichum truncatum* (ERG 133). IFD: Inativação Fotodinâmica. CL50: concentração letal 50%; CL90: concentração letal 90%.

4.2.1 Intensidade luminosa

A luz é um dos componentes fundamentais da IFD e, em relação à iluminação do processo, são importantes as definições de irradiância e fluência, que correspondem a termos utilizados em fotobiologia.

Segundo Bossini (2007, p. 32), o termo irradiância é utilizado para indicar a “potência de saída da luz por unidade de área de irradiação, geralmente expressa

em mW.cm^{-2} ou W.cm^{-2} ". O equipamento Lumacare[®] LC 122 tem a capacidade de irradiância variável entre 20 e $>1000 \text{ mW.cm}^{-2}$ e a fibra óptica utilizada abrange comprimentos de onda compreendidos entre 400 e 800 nm (LUMACARE, 2016).

Para os estudos de IFD em *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) a irradiância foi estabelecida em 50 mW.cm^{-2} .

Estudos anteriores de inativação fotodinâmica de conídios de fungos filamentosos evidenciaram o emprego de irradiâncias mais elevadas. Gomes et al. (2011) utilizaram 200 mW.cm^{-2} ao avaliar a IFD de conídios de *Penicillium chrysogenum* e Vandresen et al. (2016) avaliaram 100 mW.cm^{-2} em conídios de *Colletotrichum graminicola*. O uso de irradiância consideravelmente inferior aos estudos descritos se relaciona ao fato de que uma iluminação de poucos milliwatts se mostra suficiente para a inativação de micro-organismos (WAINWRIGHT, 1998).

Por sua vez, o termo fluência leva em consideração o tempo de exposição à luz e consiste na energia total aplicada em determinada área, que pode ser representada por um tecido biológico (ALMEIDA-LOPES, 2003; BOSSINI, 2007) ou, no presente estudo, o meio de análise contendo os conídios dos fungos filamentosos em avaliação. Para o cálculo da fluência deve ser multiplicado o valor da irradiância, em watts por centímetro quadrado (W.cm^{-2}), pelo tempo de exposição, em segundos (s). A fluência é expressa na unidade de Joules (J) por centímetro quadrado (J.cm^{-2}) e também pode ser denominada densidade de energia. (ALMEIDA-LOPES, 2003; BOSSINI, 2007). Sendo assim, a multiplicação da irradiância aplicada de 50 mW.cm^{-2} ($0,05 \text{ W.cm}^{-2}$) pelo tempo de exposição de trinta minutos (1800 segundos), resulta em uma fluência de 90 J.cm^{-2} .

Nos processos de IFD, uma iluminação de baixa potência processada por um período mais longo pode proporcionar, em termos de morte celular, resultados distintos daqueles obtidos a partir de uma iluminação de potência mais alta por períodos mais curtos (WAINWRIGHT, 1998). Assim, para avaliação da IFD de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133), foi empregada irradiância duas vezes inferior e um tempo de exposição mais longo que o relatado por Vandresen et al (2016). Em termos de fluência, o valor de 90 J.cm^{-2} foi avaliado em ambos os estudos.

O intervalo de comprimentos de onda que a fibra óptica da Lumacare[®] LC 122 abrange compreende uma região ampla do espectro eletromagnético (380-780 nm). (LUMACARE, 2016). O dado é importante, uma vez que deve ocorrer a

sensibilização do derivado porfirínico, ou seja, a absorção de um fóton. (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008). Isso é necessário para que as mudanças eletrônicas e, conseqüentemente, as reações da IFD ocorram de maneira satisfatória. (BONNETT; MARTÍNEZ, 2001; DONNELLY; MCCARRON, TUNNEY, 2008).

As porfirinas em estudo exibem absorção máxima (pico da banda Soret) em comprimentos de onda semelhantes, variando entre 419 nm (Di-*trans*-Py⁺) e 445 nm (Mono-Py⁺). Os demais derivados porfirínicos demonstram absorção máxima em comprimentos de onda intermediários: 421 nm (Di-*cis*-Py⁺), 422 nm (Tri-Py⁺) e 426 nm (Tetra-Py⁺). (VANDRESEN, 2013). Portanto, a fonte luminosa utilizada e os respectivos comprimentos de onda por ela abangidos foram adequados para a ocorrência das transições eletrônicas necessárias para o processo de IFD.

Para que tais transições se processem, além da iluminação em comprimentos de onda específicos, é fundamental a estabilidade das porfirinas frente à radiação utilizada. Embora a porfirina Mono-Py⁺ tenha demonstrado a menor fotoestabilidade dentre todos os compostos (88% da absorbância inicial após a iluminação) todos os derivados foram considerados fotoestáveis. (VANDRESEN et al, 2016).

Apesar do período de iluminação ser inferior ao utilizado na avaliação da IFD em *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133), a aplicação de irradiância duas vezes superior resulta em uma dose de energia mais elevada (120 J.cm⁻²), permitindo a consideração da fotoestabilidade avaliada anteriormente por Vandresen et al. (2016) nos resultados obtidos no presente estudo.

Os micro-organismos *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) estão diretamente envolvidos com a agricultura e, assim, pode ser empregada a luz solar como fonte luminosa na aplicação da IFD no campo. Nesse aspecto, os parâmetros previamente descritos de irradiância, fluência e comprimentos de onda devem ser considerados para essa fonte de luz. Em pesquisa executada por Menezes et al. (2014a), foi utilizada a luz solar como fonte luminosa. De acordo com os autores, os valores de irradiância observados foram variáveis entre 2,9 e 20,7 mW.cm⁻² e o espectro solar compreendeu uma região ampla (aproximadamente 320-800 nm), que abrange os comprimentos de onda de absorção máxima dos derivados porfirínicos em investigação.

Os valores de fluência obtidos nos experimentos empregando a Lumacare[®] LC 122 e em campo (luz solar) podem atingir níveis semelhantes. Diante disso, mesmo a irradiância sendo variável e inferior quando se utiliza a luz solar, o período de exposição à luz é superior em campo quando comparado ao utilizado nos experimentos *in vitro*. Assim, nas condições avaliadas no presente estudo, esses ensaios podem contribuir com o entendimento de uma IFD realizada em campo, a qual usa a radiação solar como fonte luminosa.

4.2.2 Derivados porfirínicos

Os derivados porfirínicos catiônicos (FIGURA 9, p. 42) foram avaliados em cinco concentrações, a fim de ser obtida a curva para o cálculo posterior da CL 50 e CL 90. Todos os compostos foram avaliados em concentrações inferiores ou iguais a $2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Essa foi escolhida com base no estudo de Vandresen et al. (2016) que mostrou que uma concentração de $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi suficiente para ocasionar uma inativação significativa (Tetra-Py⁺) ou mesmo total (Di-*trans*-Py⁺ e Tri-Py⁺) de conídios do fungo filamentoso *Colletotrichum graminicola* juntamente com o emprego de uma fluência de 90 J.cm^{-2} .

A partir da concentração de $2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, as demais concentrações utilizadas para as porfirinas foram definidas experimentalmente (TABELA 3, p. 50), a partir de testes de IFD. Assim, pode ser obtida a região onde foi verificada a linearidade na IFD para os diferentes derivados e micro-organismos.

Em relação às concentrações aplicadas nos controles escuros, essas se mostraram superiores ou iguais à maior concentração aplicada em testes de IFD (TABELA 4, p. 52). Isso permitiu a avaliação do efeito desses derivados isoladamente, ou seja, na ausência de iluminação, para todas as porfirinas catiônicas testadas e em conídios de ambos os fungos filamentosos.

4.3 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO* DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133)

Inicialmente, a inativação fotodinâmica *in vitro* promovida por derivados porfirínicos catiônicos em relação aos conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*

(1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG133) foi avaliada por meio de análise estatística. Os efeitos provenientes da iluminação e das porfirinas isoladamente foram avaliados e estão descritos nos controles.

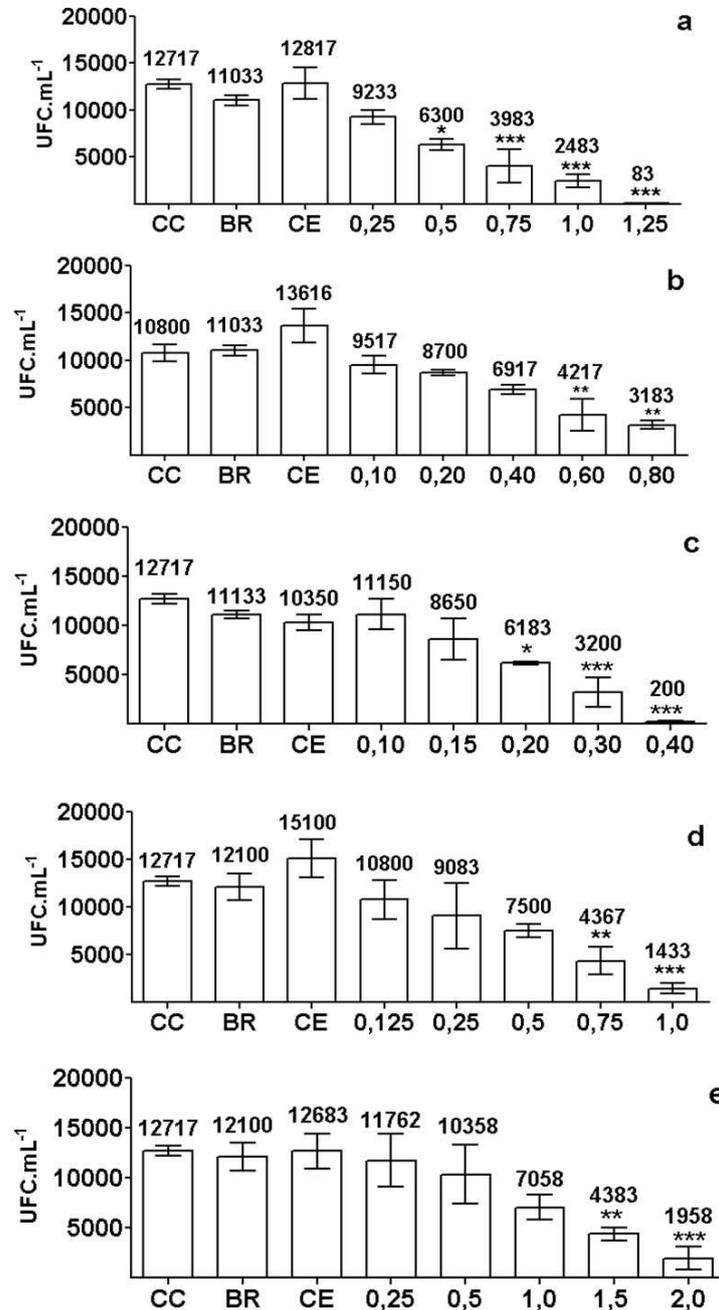
Posteriormente os valores da concentração letal 50% (CL50) e concentração letal 90% (CL90) foram determinados para os cinco compostos avaliados em ambos os fitopatógenos. Sequencialmente foram evidenciados os estudos de interação entre conídios e as porfirinas, representados pelos ensaios de espectrofluorimetria e de microscopia de fluorescência.

4.3.1 Inativação fotodinâmica *in vitro* de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143)

Em relação a conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143), os dados obtidos para a IFD empregando diferentes concentrações de porfirinas catiônicas e fluência de 90 J.cm⁻², assim como para os controles, estão sumarizados na FIGURA 17. Os resultados estão expressos em UFC.mL⁻¹. Acima das barras constam os valores das médias obtidas a partir das triplicatas realizadas (UFC.mL⁻¹).

Todos os derivados porfirínicos foram capazes de promover a inativação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) nas concentrações avaliadas (TABELA 3, p. 50). A análise estatística revelou que mesmo em concentrações baixas as porfirinas já foram suficientes para ocasionar inativação significativa dos conídios do micro-organismo em comparação com o “branco”, ou seja, na ausência de iluminação e fotossensibilizador. Isso ocorreu especialmente com o emprego dos derivados dipiridilados (Di-*trans*-Py⁺ e Di-*cis*-Py⁺), para os quais as concentrações de 0,6 e 0,2 μmol.L⁻¹, respectivamente já foram suficientes para ocasionar inativação significativa do micro-organismo. Em relação aos demais compostos, Mono-Py⁺ e Tri-Py⁺ demonstraram uma eficiência superior, visto que, para esses, morte celular significativa foi verificada na concentração de 0,5 e 0,75 μmol.L⁻¹, enquanto que para Tetra-Py⁺ apenas a concentração de 1,5 μmol.L⁻¹ ocasionou efeitos significativos.

FIGURA 17 – INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO* DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) EMPREGANDO CINCO MESO-TETRA-ARIL PORFIRINAS CATIÔNICAS ESTRUTURALMENTE RELACIONADAS.



FONTE: O autor (2016)

NOTA: a: Mono-Py⁺, b: Di-*trans*-Py⁺, c: Di-*cis*-Py⁺, d: Tri-Py⁺; e: Tetra- Py⁺. UFC: Unidades Formadoras de Colônia; CC: controle claro (ausência de fotossensibilizador); BR (ausência de fotossensibilizador e iluminação); CE: controle escuro (ausência de iluminação). Os resultados estão expressos empregando UFC por mililitro. Os números acima das barras representam o valor médio (UFC.mL⁻¹) das triplicatas observadas em cada avaliação. As unidades das concentrações teste descritas correspondem a μmol.L⁻¹. Níveis de significância de acordo com teste de Bonferroni (testes e controles comparados ao branco):* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. As barras indicam o desvio padrão entre as triplicatas.

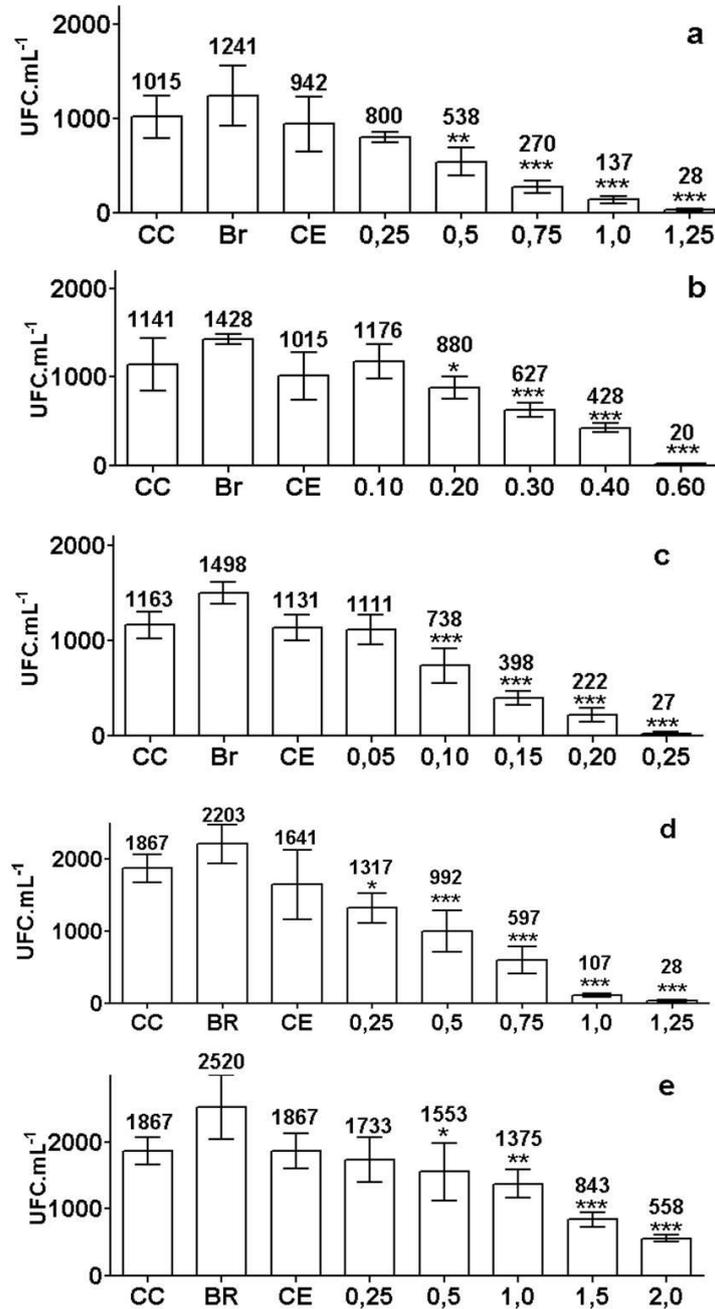
A diminuição da viabilidade celular (UFC.mL⁻¹) em comparação com o “branco” foi evidente quando utilizadas as concentrações de porfirinas acima relacionadas. Em termos percentuais, quando comparadas ao “branco”, a porfirina Di-*cis*-Py⁺ na concentração de 0,2 µmol.L⁻¹ proporcionou uma redução (UFC.mL⁻¹) de 54% na viabilidade dos conídios; Mono-Py⁺ (0,5 µmol.L⁻¹) promoveu diminuição de 53%; Di-*trans*-Py⁺ (0,6 µmol.L⁻¹) ocasionou morte celular de 62%, os derivados Tri-Py⁺ (0,75 µmol.L⁻¹) e Tetra-Py⁺ (1,5 µmol.L⁻¹) propiciaram redução aproximada de 64%.

Em relação aos controles, não foram evidenciadas diferenças significativas na viabilidade celular para nenhum dos cinco derivados quando foi comparado o “branco” com controle claro e controle escuro. Em se tratando de IFD, o efeito danoso deve ocorrer apenas na presença dos três componentes sobre o objeto em avaliação (luz, fotossensibilizador e oxigênio). (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008). No presente estudo, todas as porfirinas catiônicas avaliadas podem ser denominadas fotossensibilizadores, pois não foram capazes de ocasionar danos celulares significativos isoladamente, ou seja, na ausência de iluminação. De maneira similar, no controle claro, a aplicação de fluência de 90 J.cm⁻² não ocasionou danos significativos em conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143), sendo adequada para emprego na IFD para esse micro-organismo.

4.3.2 Inativação Fotodinâmica *in vitro* de conídios de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133)

A FIGURA 18 (p. 70) evidencia os resultados da IFD de conídios de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) em gráfico de colunas correlacionando branco, controle claro, controle escuro e as diferentes concentrações de derivados porfirínicos com o logaritmo do número de unidades formadoras de colônias por mililitro (log UFC.mL⁻¹) após emprego de uma fluência de 90 J.cm⁻².

FIGURA 18 – INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO* DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) EMPREGANDO CINCO MESO-TETRA-ARIL PORFIRINAS CATIÔNICAS ESTRUTURALMENTE RELACIONADAS.



FONTE: O autor (2016)

NOTA: a: Mono-Py⁺, b: Di-*trans*-Py⁺, c: Di-*cis*-Py⁺, d: Tri-Py⁺; e: Tetra- Py⁺. UFC: Unidades Formadoras de Colônia; CC: controle claro (ausência de fotossensibilizador); BR (ausência de fotossensibilizador e iluminação); CE: controle escuro (ausência de iluminação). Os resultados estão expressos empregando UFC por mililitro. Os números acima das barras representam o valor médio (UFC.mL⁻¹) das triplicatas observadas em cada avaliação. As unidades das concentrações teste descritas correspondem a $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Níveis de significância de acordo com teste de Bonferroni (testes e controles comparados ao branco):* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. As barras indicam o desvio padrão obtido entre as triplicatas.

De maneira semelhante ao verificado para conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143), para *Colletotrichum truncatum* (ERG133) a IFD empregando derivados porfirínicos catiônicos demonstrou eficiência na inativação do micro-organismo. Nenhum dos derivados apresentou atividade fungicida, fato comprovado pela ausência de diferença significativa entre os controles escuros e o “branco”. O mesmo foi observado para os controles claros, onde foi aplicada apenas uma fluência de 90 J cm^{-2} . Não houve morte celular significativa do micro-organismo em nenhum dos controles.

Os derivados mais eficientes foram Di-*trans*-Py⁺ e Di-*cis*-Py⁺, para os quais concentrações de 0,2 e 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ proporcionaram inativação significativa do micro-organismo. Para Tri-Py⁺, Mono-Py⁺ e Tetra-Py⁺ efeito semelhante foi observado em concentrações de 0,25; 0,5 e 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente. De acordo com a análise estatística, esses resultados mostraram níveis de significância distintos.

Para esse fitopatógeno, a redução percentual na viabilidade celular (em UFC.mL⁻¹) quando comparada ao “branco” por Di-*cis*-Py⁺ foi de 51% na concentração de 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ da porfirina. Os derivados Di-*trans*-Py⁺ (0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e Tri-Py⁺ (0,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) ocasionaram morte celular de 38 e 40% UFC.mL⁻¹, respectivamente. Já, para Mono-Py⁺ e Tetra-Py⁺, na mesma concentração (0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) proporcionaram inativação significativa, sendo que a porfirina monocationizada inativou (em UFC.mL⁻¹) 57% enquanto Tetra-Py⁺ propiciou inativação de 38%.

De maneira geral, considerando a IFD, para ambos os fitopatógenos, as porfirinas dipiridiladas foram mais eficientes, seguidas pela Tri-Py⁺ e Mono-Py⁺ e Tetra-Py⁺, respectivamente. Embora com diferenças nas concentrações, todos os derivados porfirínicos catiônicos foram eficientes quando empregados como fotossensibilizadores na IFD de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG133), visto que contribuíram para a inativação significativa dos conídios do micro-organismo mesmo em concentrações reduzidas, inferiores a 2,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A inativação observada a partir do emprego das porfirinas corrobora com estudos anteriores relacionados à inativação de micro-organismos empregando porfirinas contendo cargas positivas em suas estruturas. (CORMICK et

al., 2009; GOMES et al., 2011; MITRA et al., 2011; QUIROGA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2012; BEIRÃO et al., 2014; SIMÕES et al., 2016).

Os resultados observados evidenciam que para a IFD dos conídios dos fitopatógenos avaliados, concentrações reduzidas de porfirinas em uma fluência inferior já são suficientes para ocasionar a morte celular.

Para a IFD de fungos filamentosos, estudo de Gomes et al. (2011) com conídios de *Penicillium chrysogenum* mostrou o emprego de concentrações consideravelmente maiores de Tetra-Py⁺ (5,0 a 100,0 µmol.L⁻¹) em fluência superior (240 J.cm⁻²). Os autores relataram que a concentração de 50,0 µmol.L⁻¹ foi eficiente, proporcionando redução superior a 90% UFC.mL⁻¹ na viabilidade do micro-organismo a partir da IFD. Por sua vez, em conídios de *Colletotrichum graminicola*, quando aplicada a mesma fluência empregada no presente estudo (90 J.cm⁻²), e uma concentração mais elevada (5,0 µmol.L⁻¹), as porfirinas Di-*trans*-Py⁺ e Tri-Py⁺ foram capazes de ocasionar inativação total do micro-organismo. (VANDRESEN et al., 2016). Já a porfirina Tetra-Py⁺, na mesma concentração, proporcionou uma redução da viabilidade celular superior a 90% UFC.mL⁻¹.

As diferenças verificadas entre os estudos evidenciam que a IFD é um processo diretamente relacionado à concentração de fotossensibilizador utilizada e fluência aplicada.

4.4 CONCENTRAÇÃO LETAL 50% e CONCENTRAÇÃO LETAL 90%

A concentração letal 50% (CL50) pode ser definida como a concentração de determinado composto químico que possui a capacidade de causar a morte de 50% dos organismos de uma dada população (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). Por sua vez, a concentração letal 90% (CL90) corresponde à concentração do composto químico que é capaz de ocasionar a morte de 90% dos organismos da população.

De acordo com a Farmacopeia Americana (USP, 2006) para a obtenção da equação da reta a ser empregada nos cálculos em teste microbiológico deve ser respeitado o intervalo que abrange a linearidade. Segundo os autores, a linearidade em uma avaliação microbiológica quantitativa consiste na “habilidade do teste produzir resultados que são proporcionais à concentração de micro-organismos

presentes na amostra em um dado intervalo”. As concentrações foram selecionadas de modo que estivessem contidas nesse intervalo.

Para determinar a relação linear dos experimentos, foi utilizado o cálculo do quadrado do coeficiente de correlação (r^2), o qual foi realizado a partir dos dados de regressão linear. Segundo a Farmacopeia Americana a utilização do r^2 é apropriada, pois se relaciona à linearidade. É estabelecido que, para ensaios microbiológicos, o valor de r^2 não deve ser inferior a 0,95 (USP, 2006).

Com o intuito de calcular a CL50 e CL90 para cada porfirina, foram utilizadas cinco diferentes concentrações para os distintos derivados avaliados (TABELA 3, p. 50), a fim de ser observado um valor de r^2 pertinente de acordo com a Farmacopeia Americana. A partir da obtenção de um valor adequado do quadrado do coeficiente de correlação, foi permitido o cálculo da CL 50 e CL90 em relação à IFD utilizando as cinco porfirinas catiônicas para ambos os fitopatógenos.

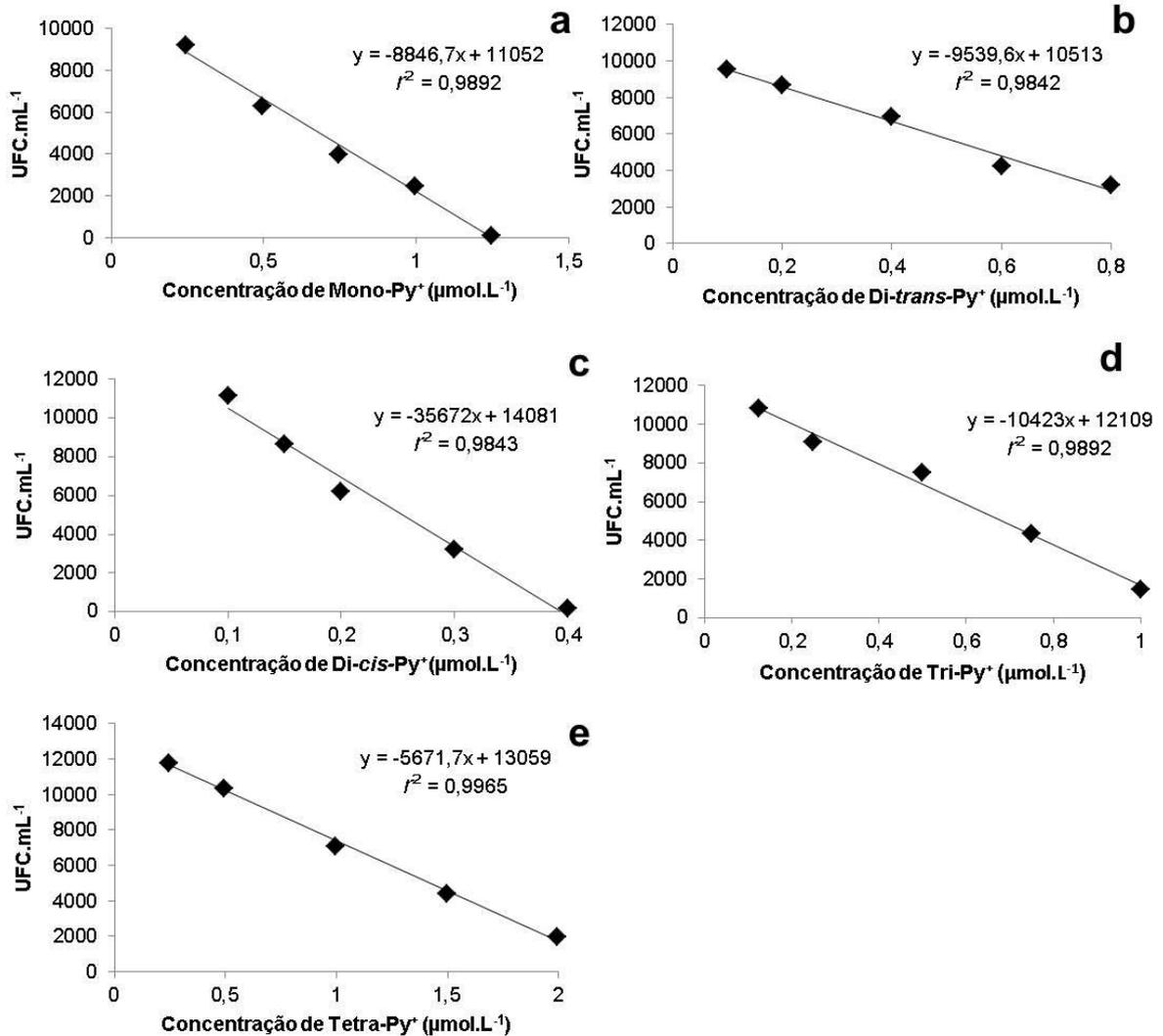
4.4.1 Concentração Letal 50% e Concentração Letal 90% na IFD de porfirinas catiônicas para conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143)

A FIGURA 19 (p. 74) evidencia as curvas obtidas para a IFD de conídios *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) empregando os derivados porfirínicos com as respectivas equações da reta e os quadrados dos coeficientes de correlação (r^2).

Os valores observados para r^2 para os cinco derivados porfirínicos avaliados se mostraram adequados ($>0,95$). Por essa razão, podem ser calculados os valores de CL50 e CL 90 para cada porfirina.

Os cálculos foram realizados utilizando como parâmetro os valores em UFC.mL⁻¹ observados para o controle “Branco”, realizado na ausência de porfirinas e iluminação. Esses valores correspondentes a 100% foram multiplicados por 0,5 e 0,1, a fim de serem obtidos os números relacionados ao crescimento de 50% e 10% dos micro-organismos, respectivamente. A seguir os números foram aplicados nas equações da reta correspondentes a cada porfirina.

FIGURA 19 – GRÁFICOS DEMONSTRANDO AS LINHAS DE TENDÊNCIA NA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO* DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) (UFC.mL⁻¹) EMPREGANDO DERIVADOS PORFIRÍNICOS CATIÔNICOS



FONTE: O autor (2016)

NOTA: a: Mono-Py⁺, b: Di-*trans*-Py⁺, c: Di-*cis*-Py⁺, d: Tri-Py⁺; e: Tetra- Py⁺. UFC: Unidades Formadoras de Colônia. As concentrações descritas estão em $\mu\text{mol.L}^{-1}$. r^2 : Quadrado do coeficiente de correlação.

Por sua vez, a TABELA 7 mostra a CL50 e CL90 das porfirinas catiônicas com relação a conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143), juntamente com os valores (Branco x 0,5) e (Branco x 0,1) utilizados para os respectivos cálculos.

TABELA 7 – CONCENTRAÇÃO LETAL 50% (CL 50) E CONCENTRAÇÃO LETAL 90% (CL 90) PARA CINCO DERIVADOS PORFIRÍNICOS CATIÔNICOS EM CONÍDIOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (1143).

Porfirina	Branco (UFC.mL ⁻¹)	(Branco x 0,5)	(Branco x 0,1)	CL 50 (μmol.L ⁻¹)	CL90 (μmol.L ⁻¹)
Mono-Py⁺	11033	5516,5	1103,3	0,62	1,12
Di-trans-Py⁺	11033	5516,5	1103,3	0,52	0,99
Di-cis-Py⁺	11133	5566,5	1113,3	0,24	0,36
Tri-Py⁺	12100	6050	1210	0,58	1,04
Tetra-Py⁺	12100	6050	1210	1,23	2,09

FONTE: O autor (2016)

NOTA: * Os valores de CL50 e CL90 foram obtidos, respectivamente, a partir da substituição do valor de (Branco x 0,5) e (Branco x 0,1) no “y” da respectiva equação da reta do derivado correspondente.

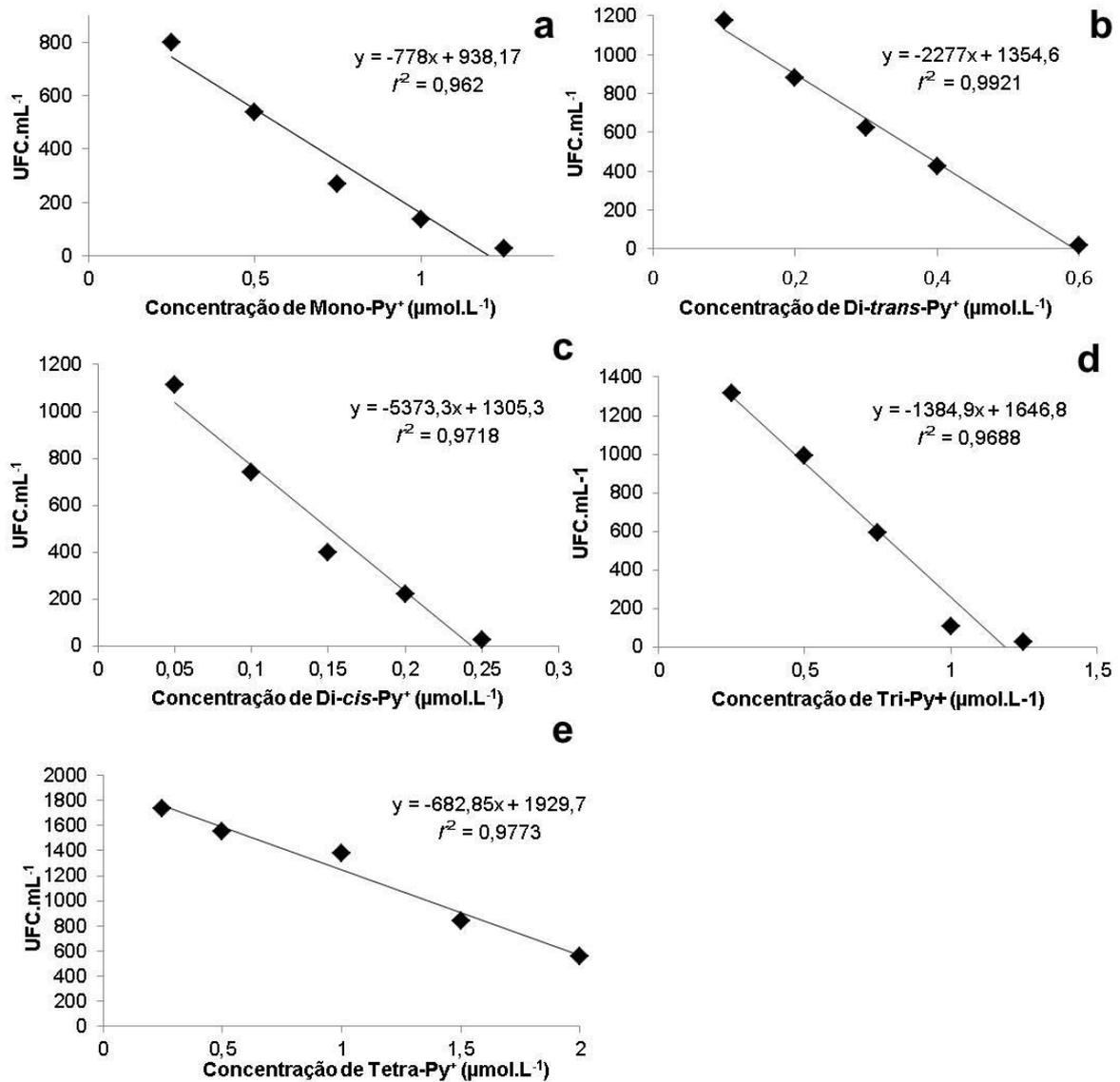
Considerando os resultados observados para a CL50 e CL90, a eficiência das porfirinas catiônicas como fotossensibilizadores na IFD tendo como objeto de estudo conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143), em ordem crescente, foi Tetra-Py⁺ < Mono-Py⁺ < Tri-Py⁺ < Di-trans-Py⁺ < Di-cis-Py⁺. As porfirinas catiônicas, nessa ordem, mostraram valores decrescentes de CL50 e CL90. Embora existam diferenças em suas atividades e concentração para inativação significativa do micro-organismo (FIGURA 17, p. 68), valores CL 50 e CL90 para os derivados monopiridilado, tripiridilado e dipiridilado na forma *trans* foram próximos.

4.4.2 Concentração Letal 50% e Concentração Letal 90% na IFD de porfirinas catiônicas para conídios de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133)

As curvas obtidas para a IFD de conídios *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) empregando os derivados porfirínicos com os respectivos valores de r^2 constam na FIGURA 20 (p. 76). Os dados foram relacionados a partir das médias observadas na triplicata de cada uma das cinco concentrações de cada porfirina testada.

Da mesma maneira que para *Colletotrichum lindemuthianum* (1143), os valores de r^2 observados para as cinco porfirinas catiônicas foram superiores a 0,95. Os cálculos foram realizados da mesma maneira que para o fitopatógeno de feijão.

FIGURA 20 – GRÁFICOS DEMONSTRANDO AS LINHAS DE TENDÊNCIA NA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO* DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) (UFC. mL⁻¹) EMPREGANDO DERIVADOS PORFIRÍNICOS CATIÔNICOS



FONTE: O autor (2016).

NOTA: a: Mono-Py⁺, b: Di-*trans*-Py⁺, c: Di-*cis*-Py⁺, d: Tri-Py⁺; e: Tetra-Py⁺. UFC: Unidades Formadoras de Colônia. As concentrações descritas estão em $\mu\text{mol.L}^{-1}$. r^2 : Quadrado do coeficiente de correlação.

De acordo com os resultados observados para a CL50 e CL90 (TABELA 8) a eficiência das porfirinas catiônicas como fotossensibilizadores na IFD tendo como objeto de estudo conídios de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133), em ordem crescente, foi Tetra-Py⁺ < Mono-Py⁺ < Tri-Py⁺ < Di-*trans*-Py⁺ < Di-*cis*-Py⁺. As porfirinas catiônicas, nessa ordem, mostraram valores decrescentes de CL50 e CL90.

TABELA 8 – CONCENTRAÇÃO LETAL 50% (CL 50) E CONCENTRAÇÃO LETAL 90% (CL 90) PARA CINCO DERIVADOS PORFIRÍNICOS CATIÔNICOS EM CONÍDIOS DE *Colletotrichum truncatum* (ERG 133)

Porfirina	Branco (UFC.mL ⁻¹)	(Branco X 0,5)	(Branco X 0,1)	CL 50 (µmol.L ⁻¹)	CL90 (µmol.L ⁻¹)
Mono-Py⁺	1241	620,5	124,1	0,41	1,05
Di-trans-Py⁺	1428	714	142,8	0,28	0,53
Di-cis-Py⁺	1498	749	149,8	0,10	0,22
Tri-Py⁺	2203	1101,5	220,3	0,39	1,03
Tetra-Py⁺	2530	1265	253,0	0,97	2,46

FONTE: O autor (2016)

NOTA: * Os valores de CL50 e CL90 foram obtidos, respectivamente, a partir da substituição do valor de (Branco x 0,5) e (Branco x 0,1) no “y” da respectiva equação da reta do derivado correspondente.

Na literatura, em estudos de IFD, é relatada a eficiência do processo em relação a micro-organismos comparando as diferentes concentrações de um mesmo fotossensibilizador e entre derivados com estruturas químicas diversas, não sendo evidenciadas no levantamento bibliográfico realizado as determinações das concentrações letais 50% (CL50) e 90% (CL90). (GOMES et al., 2011; ALVES et al., 2013; VANDRESEN et al., 2016; SIMÕES et al., 2016). Uma exceção consistiu em estudo realizado por Lazzaro et al. (2004). Em avaliação de diferentes derivados de fenilfenalenonas como fotossensibilizadores na IFD *in vitro* de *Fusarium oxysporum*, os autores relataram valores de CL50 variáveis entre < 1 e 29 µmol.L⁻¹. Portanto, considerando os valores de CL50, as porfirinas catiônicas avaliadas no presente estudo foram comparáveis às moléculas fotossensibilizadoras mais eficientes relacionadas pelos autores. (LAZZARO et al., 2004).

É importante ressaltar que, no presente estudo, as concentrações foram calculadas a partir da disponibilidade de dados proporcionada pelas avaliações da IFD, em relação ao número de concentrações e à obtenção dos valores dos quadrados dos coeficientes de correlação adequados. Assim, esses parâmetros puderam ser estabelecidos e destacaram as variações observadas na IFD de fitopatógenos *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) empregando as cinco porfirinas catiônicas como fotossensibilizadores.

4.5 INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE PORFIRINAS CATIÔNICAS E CONÍDIOS DE *Colletotrichum* spp.

A interação entre os fotossensibilizadores e micro-organismos alvos da IFD consiste em um aspecto auxiliar na avaliação da eficiência fotodinâmica, pois prediz a magnitude desse contato (ALVES et al., 2009; CORMICK et al., 2009; GOMES et al., 2011 e SIMÕES et al., 2016).

Nesse sentido, a avaliação por espectrofluorimetria e a aplicação da técnica de microscopia de fluorescência foram empregadas para avaliação da interação entre conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133). Ambas as análises estão baseadas na capacidade das porfirinas de emitir fluorescência na presença de uma luz excitatória. Elas são denominadas fluoróforos, pois “absorvem energia quando expostas a comprimentos de onda específicos (excitação) e reemitem essa energia em um comprimento de onda mais longo”. (STRACHAN; READ, 2011, p. 201).

Para os derivados porfirínicos em estudo, os comprimentos de onda de excitação se encontram na região próxima a 420 nm (TABELA 5, p. 54) (banda Soret) e a emissão, reside na faixa entre 600-750 nm.

4.5.1 Avaliação por espectrofluorimetria

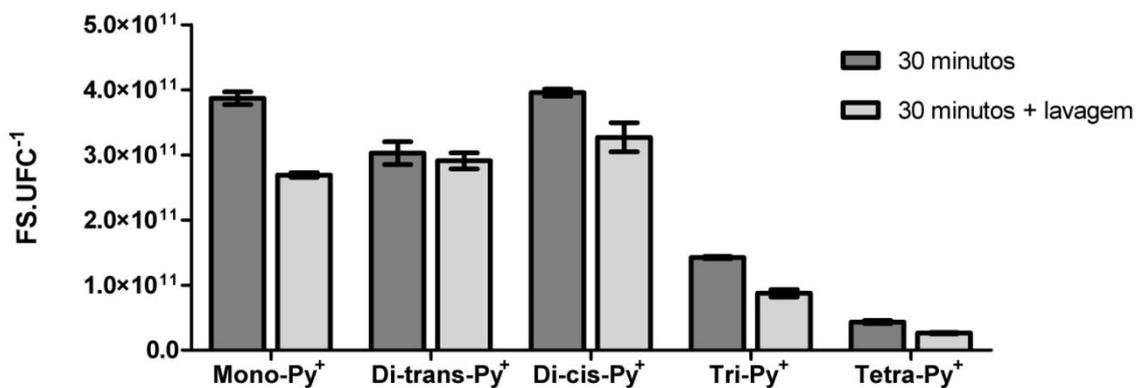
A avaliação por espectrofluorimetria representa um ensaio quantitativo, que indica a quantidade de moléculas das porfirinas catiônicas que entram em contato com os conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133).

Para essa avaliação da interação *in vitro* entre o micro-organismo e os derivados porfirínicos foram empregadas a concentração de 2,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e tempo de incubação de trinta minutos, o mesmo utilizado na IFD nos conídios dos fungos filamentosos. A concentração foi selecionada pelo fato de ser a mais elevada dentre as testadas para os compostos na IFD. A presença de um maior número de moléculas permite uma mensuração mais adequada da relação entre as porfirinas e os micro-organismos.

4.5.1.1 Interação *in vitro* entre fotossensibilizadores e *Colletotrichum lindemuthianum* (1143)

A FIGURA 21 mostra os resultados obtidos por espectrofluorimetria para a ligação entre os derivados porfirínicos catiônicos e conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143).

FIGURA 21 – INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE FOTOSSENSIBILIZADORES E CONÍDIOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE LAVAGEM APÓS TRINTA MINUTOS DE INCUBAÇÃO NO ESCURO.



FONTE: O autor (2016).

NOTA: FS: fotossensibilizador; UFC: unidade formadora de colônia (conídio). A concentração de derivados porfirínicos empregada foi de 2,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Para *Colletotrichum lindemuthianum* (1143), a ordem crescente de interação *in vitro* foi Tetra-Py⁺ < Tri-Py⁺ < Di-trans-Py⁺ < Mono-Py⁺ < Di-cis-Py⁺.

O composto Mono-Py⁺ e as porfirinas dicationizadas foram as que mostraram interação *in vitro* superior com conídios do patógeno de feijão, concordando com os dados prévios obtidos para *Colletotrichum graminicola* (VANDRESEN et al., 2016). A principal variação residiu no composto Mono-Py⁺, que demonstrou interação superior com conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) ($2,0 - 3,1 \times 10^{11}$ moléculas de porfirina.conídio⁻¹) em relação à *Colletotrichum graminicola* (inferior a $2,0 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹) descrita por Vandresen et al. (2016).

Além da variação biológica existente entre diferentes espécies, no caso do segundo micro-organismo, a concentração de Mono-Py⁺ utilizada foi inferior, o que pode ter contribuído na redução da formação de agregados de moléculas do composto, favorecendo a interação entre o micro-organismo e o derivado porfirínico.

As porfirinas tendem a formar agregados moleculares (CEKLOVSKY, 2009). Especialmente Mono-Py⁺, pelo fato de conter em sua estrutura apenas uma carga positiva, possui características predominantemente hidrofóbicas, sendo pouco solúvel em água, o que contribui para o fenômeno da agregação. Logo, a concentração reduzida para 2,0 µmol.L⁻¹ (daquela de 25,0 µmol.L⁻¹ avaliada inicialmente para *Colletotrichum graminicola*) proporcionou diminuição do efeito da agregação em meio aquoso, facilitando o contato entre o micro-organismo e as moléculas de porfirina.

Confrontando com a IFD realizada para esse fitopatógeno, as porfirinas com menores valores de CL50 (0,24 e 0,52 µmol.L⁻¹, respectivamente) foram os compostos dicationizados, Di-*cis*-Py⁺ e Di-*trans*-Py⁺ (TABELA 7, p. 75). Tais resultados coincidem com os obtidos no estudo de interação, pois os compostos contendo duas cargas positivas, aliados à Mono-Py⁺, foram os que demonstraram um maior número de moléculas de porfirina.conídio⁻¹.

Para o derivado monocationizado, sua eficiência fotodinâmica foi considerada satisfatória, tendo em vista o valor de CL50 de 0,62 µmol.L⁻¹ mostrando a influência de outros fatores na eficiência fotodinâmica desse derivado porfirínico.

Em relação à fotoestabilidade (TABELA 1, p. 42), a porfirina monocationizada mostrou fotoestabilidade reduzida quando comparado aos demais compostos estruturalmente relacionados. Essa diminuição pode estar relacionada à tendência de agregação da porfirina em meio aquoso, proporcionando uma redução da absorvância na metodologia empregada.

Por sua vez, os compostos tri- e tetra piridilados foram aqueles que demonstraram menor número de moléculas interagindo com cada conídio de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143). Para a IFD nesse fitopatógeno, os derivados porfirínicos contendo três e quatro cargas positivas apresentaram valores de CL50 de 0,58 e 1,23 µmol.L⁻¹, respectivamente (TABELA 7, p. 75).

Em relação à Tri-Py⁺, a eficiência fotodinâmica foi semelhante à de Mono-Py⁺, pois ambas as porfirinas mostraram valores muito próximos de CL50. A interação com conídios do fitopatógeno foi consideravelmente superior para o composto Mono-Py⁺ (quantidade aproximada de 3,0 x 10¹¹ moléculas.conídio⁻¹ para Mono-Py⁺ e 1,0 x 10¹¹ moléculas.conídio⁻¹ para Tri-Py⁺). Dessa maneira, a eficiência semelhante do composto tripiridilado pode ser atribuída às propriedades físico-

químicas e fotofísicas dessa porfirina em comparação com o derivado contendo apenas uma carga positiva. Sobre as características físico-químicas, essas estão particularmente atreladas à solubilidade em água. A presença de três cargas positivas no composto facilita a interação com o solvente polar, contribuindo para a hidrossolubilidade.

Em relação à fotoestabilidade, para Tri-Py⁺ essa foi evidentemente superior, mostrando um decaimento de 4% da absorbância na banda Soret após iluminação, enquanto que para Mono-Py⁺ esse decaimento foi de 12%. (TABELA 1, p. 42). A fotoestabilidade superior atrelada à maior hidrossolubilidade de Tri-Py⁺ em detrimento da interação mais elevada de Mono-Py⁺ com conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) pode ter contribuído para a observação de efeitos fotodinâmicos semelhantes, refletidos em valores próximos de CL50 para ambos os derivados porfirínicos.

Para Tetra-Py⁺, foi observada interação de um menor número de moléculas por conídio do micro-organismo dentre todas as porfirinas avaliadas. Tais resultados coincidiram com o valor observado para CL50, correspondente ao mais elevado (1,23 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) correlacionando com os demais derivados porfirínicos. Foi demonstrada a eficiência fotodinâmica desse derivado, em menor grau, porém evidente. Essa se relaciona, além da interação (em menor grau, mas presente), à elevada fotoestabilidade do composto (TABELA 1, p. 42) e superior hidrossolubilidade, devido à presença de quatro cargas positivas na estrutura química do composto.

O procedimento de lavagem com TFS permite a remoção de moléculas ligadas fracamente aos conídios do micro-organismo. Comparativamente, após o procedimento de lavagem, a ordem crescente de interação foi Tetra-Py⁺ < Tri-Py⁺ < Mono-Py⁺ < Di-*trans*-Py⁺ < Di-*cis*-Py⁺ sendo invertida apenas a ordem entre Mono-Py⁺ e Di-*trans*-Py⁺ em comparação com o procedimento na ausência de lavagem. A redução no número de moléculas que interagiram com o fungo filamentoso evidenciou que o procedimento de lavagem proporciona a eliminação de moléculas ligadas fracamente às estruturas celulares e também daqueles agregados de porfirinas. A inversão da ordem entre Mono-Py⁺ e Di-*trans*-Py⁺ pode estar relacionada à formação mais acentuada de agregados moleculares pela primeira, que são removidos a partir do procedimento de lavagem. Já a segunda mostrou uma ligação mais forte com o micro-organismo, tendo em vista que o número de

moléculas de Di-*trans*-Py⁺.conídio⁻¹ foi semelhante na ausência e presença da lavagem.

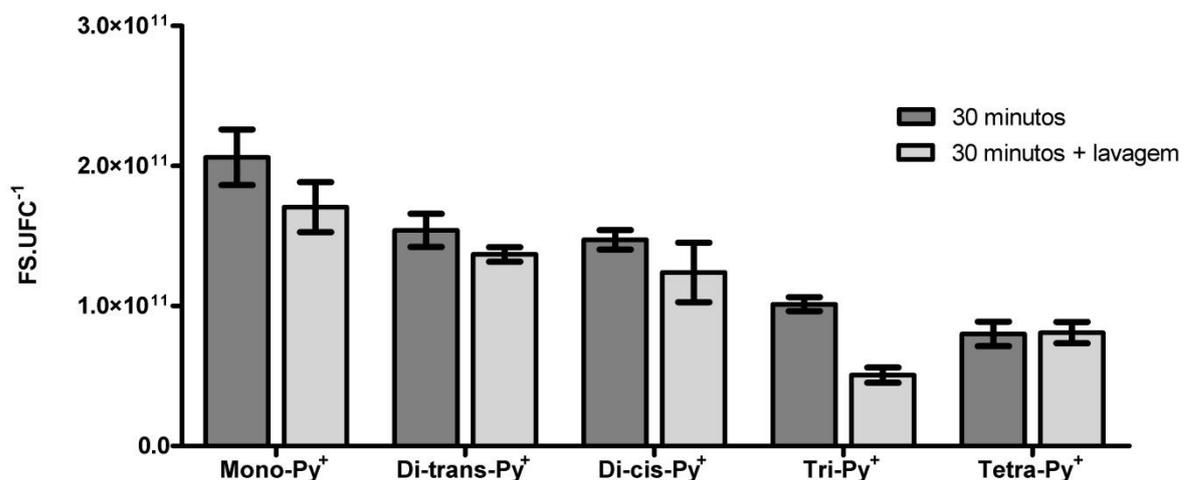
4.5.1.2 Interação *in vitro* entre fotossensibilizadores e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133)

A FIGURA 22 evidencia os resultados obtidos para a interação entre conídios de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) e os cinco derivados porfirínicos relacionando as duas condições: na presença e ausência de lavagem com TFS.

Quando utilizados em concentrações idênticas, a ordem de interação com conídios de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) foi: Tetra-Py⁺ < Tri-Py⁺ < Di-*cis*-Py⁺ < Di-*trans*-Py⁺ < Mono-Py⁺.

Embora em níveis inferiores, a interação entre o fitopatógeno de soja e as porfirinas catiônicas foi semelhante à observada para *Colletotrichum lindemuthianum* (1143), diferindo apenas no derivado Mono-Py⁺, para o qual a interação foi superior em comparação com ambos os compostos dipiridilados.

FIGURA 22 – INTERAÇÃO ENTRE FOTOSSENSIBILIZADORES E CONÍDIOS DE *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE LAVAGEM APÓS TRINTA MINUTOS DE INCUBAÇÃO NO ESCURO



FONTE: O autor (2016).

NOTA: FS: fotossensibilizador; UFC: unidade formadora de colônia (conídio). A concentração de derivados porfirínicos empregada foi de 2,0 μmol.L⁻¹.

Apesar de demonstrar valores intermediários de interação com conídios do fitopatógeno de soja, em relação à IFD, da mesma maneira que para *Colletotrichum lindemuthianum* (1143), onde os menores valores de CL50 foram observados para Di-*cis*-Py⁺ e Di-*trans*-Py⁺ (0,10 e 0,28 μM, respectivamente). Mono-Py⁺ e Tri-Py⁺ mostraram valores intermediários de CL 50 em relação ao micro-organismo (0,41 e 0,39 μM, respectivamente). Igualmente, para Tetra-Py⁺ foi observado o maior valor de CL50 dentre todos os compostos avaliados (0,97 μM), concordando com a menor interação existente entre esse derivado e os conídios.

Em relação ao procedimento de lavagem com TFS, a ordem decrescente de interação foi invertida apenas em relação à Tetra-Py⁺ e Tri-Py⁺ sendo a última a que demonstrou menores níveis de interação entre todos os compostos. Nessa condição, à exceção de Tetra-Py⁺, o número de moléculas que interagiram com o fungo filamentoso foi reduzido, evidenciando que o procedimento de lavagem proporciona a eliminação de moléculas ligadas fracamente às estruturas celulares e também daqueles agregados de porfirinas. Para Tetra-Py⁺, de acordo com os resultados obtidos, pode ser visualizada uma interação de maior força entre as moléculas de porfirina e conídios, uma vez que não foi observada diferença entre as duas condições avaliadas.

Para ambos os fungos filamentosos, a interação mostrada entre porfirinas e conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) a partir do ensaio quantitativo empregando espectrofluorimetria foi superior (10^{11} moléculas de porfirina.conídio⁻¹) às observadas por outros autores em estudos de IFD. A interação entre porfirinas e a bactéria *Escherichia coli* foi relatada por Alves et al. (2013) e Simões (2016), onde foram evidenciados valores entre 10^4 e 10^7 moléculas de porfirina.célula bacteriana⁻¹. A interação de um número inferior de moléculas com as bactérias está relacionada à sua reduzida complexidade celular desses procariotos quando comparada a fungos filamentosos (eucariotos). Por sua vez, para os micro-organismos eucarióticos, Gomes et al. (2011) relataram a interação entre porfirinas e conídios do fungo filamentoso *Penicillium chrysogenum*, descrevendo números entre 10^6 e 10^7 moléculas de porfirina.conídio⁻¹ e Vandresen et al. (2016) mostraram valores entre 10^8 e 10^9 moléculas de porfirina.conídio⁻¹ do fitopatógeno *Colletotrichum graminicola*.

As variações evidenciadas nos números de moléculas que interagem com as células se relacionam diretamente ao micro-organismo e à estrutura química dos derivados porfirínicos e, conseqüentemente, às diferentes propriedades dessas porfirinas que contribuem para maior ou menor interação. Dentre essas podem ser relacionadas a presença de cargas e a hidrossolubilidade.

4.5.2 Avaliação por microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência é uma técnica que permite a visualização de moléculas específicas que fluorescem na presença de uma luz excitatória. (MURPHY, 2001). Segundo o autor, dessa maneira é possível verificar a distribuição de determinada molécula em uma amostra.

Como descrito anteriormente, a região de excitação dos derivados porfirínicos catiônicos em estudo reside em torno de 420 nm (Banda Soret), (TABELA 5, p. 54) e a emissão entre 600-750 nm.

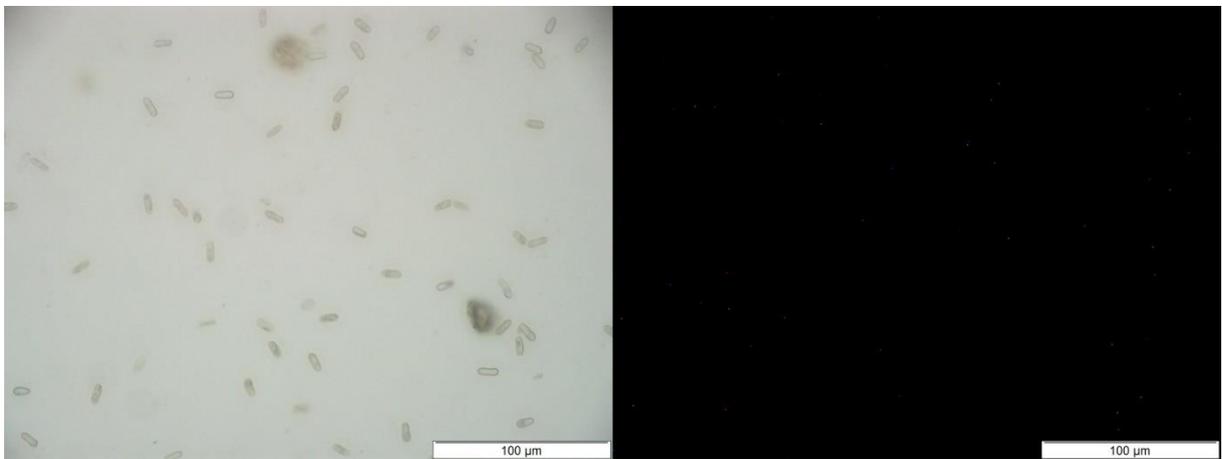
Os microscópios de fluorescência contêm filtros especiais para produzir imagens de luz fluorescente emitida a partir de moléculas excitadas contidas em uma amostra. “Esses filtros são produzidos para isolar e manipular dois conjuntos distintos de excitação e comprimentos de onda de fluorescência”. (MURPHY, 2001, p. 178). Para a avaliação da presença e interação das porfirinas com os conídios de fitopatógenos foi utilizado o filtro Texas Red (TXRed), que permite a visualização dos derivados porfirínicos a partir de uma fluorescência de coloração vermelha. Embora o comprimento de excitação proporcionado seja na região de 596 nm, a emissão na região de 620 nm (STRACHAN; READ, 2011), permite a visualização dos derivados porfirínicos.

Empregando essa metodologia, torna-se possível verificar qualitativamente se a interação previamente evidenciada pela análise por espectrofluorimetria ocorre extra ou intracelularmente, o que é indicado pela fluorescência da célula em sua totalidade ou parcialmente ou, no caso de interação externa, na ausência de fluorescência no campo em análise.

4.5.2.1 Microscopia de fluorescência de porfirinas catiônicas e *Colletotrichum lindemuthianum* (1143)

Nas análises de microscopia, inicialmente foi avaliada a fluorescência dos conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) na ausência de porfirinas (FIGURA 23), com o objetivo de verificar se as estruturas celulares *per se* emitem fluorescência nos comprimentos de onda de excitação (filtro Texas Red).

FIGURA 23 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) NA AUSÊNCIA DE PORFIRINAS



FONTE: O autor (2016).

NOTA: À esquerda está localizada a microscopia em campo claro, permitindo a visualização dos conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143). À direita se encontra a imagem do mesmo campo correlacionando a microscopia de fluorescência empregando filtro Texas Red. O aumento utilizado foi de 40 vezes.

A partir da microscopia em campo claro (FIGURA 23, esquerda) pode ser confirmada a presença de conídios hialinos, oblongos e cilíndricos descritos para *Colletotrichum lindemuthianum* (RAVA; SARTORATO, 1994).

Como observado na FIGURA 23 (direita), não foi evidenciada fluorescência no campo em análise na ausência de porfirinas, indicando a inexistência de estruturas fluorescentes diversas dos derivados porfirínicos na metodologia empregada para esse fitopatógeno.

Todas as porfirinas foram avaliadas na concentração de $10,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Essa foi selecionada tendo em vista os bons resultados obtidos para os ensaios microscópicos relacionados a Di-*trans*-Py⁺, Di-*cis*-Py⁺ e Tri-Py⁺ descritos por Vandresen et al. (2016) para conídios de *Colletotrichum graminicola*. As mesmas concentrações foram avaliadas para Mono-Py⁺ e Tetra-Py⁺ para avaliação inicial.

A FIGURA 24 (p. 87) retrata a microscopia de fluorescência da interação entre conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e os derivados porfirínicos Mono-Py⁺ (A), Di-*trans*-Py⁺ (B), Di-*cis*-Py⁺ (C) e Tri-Py⁺ (D).

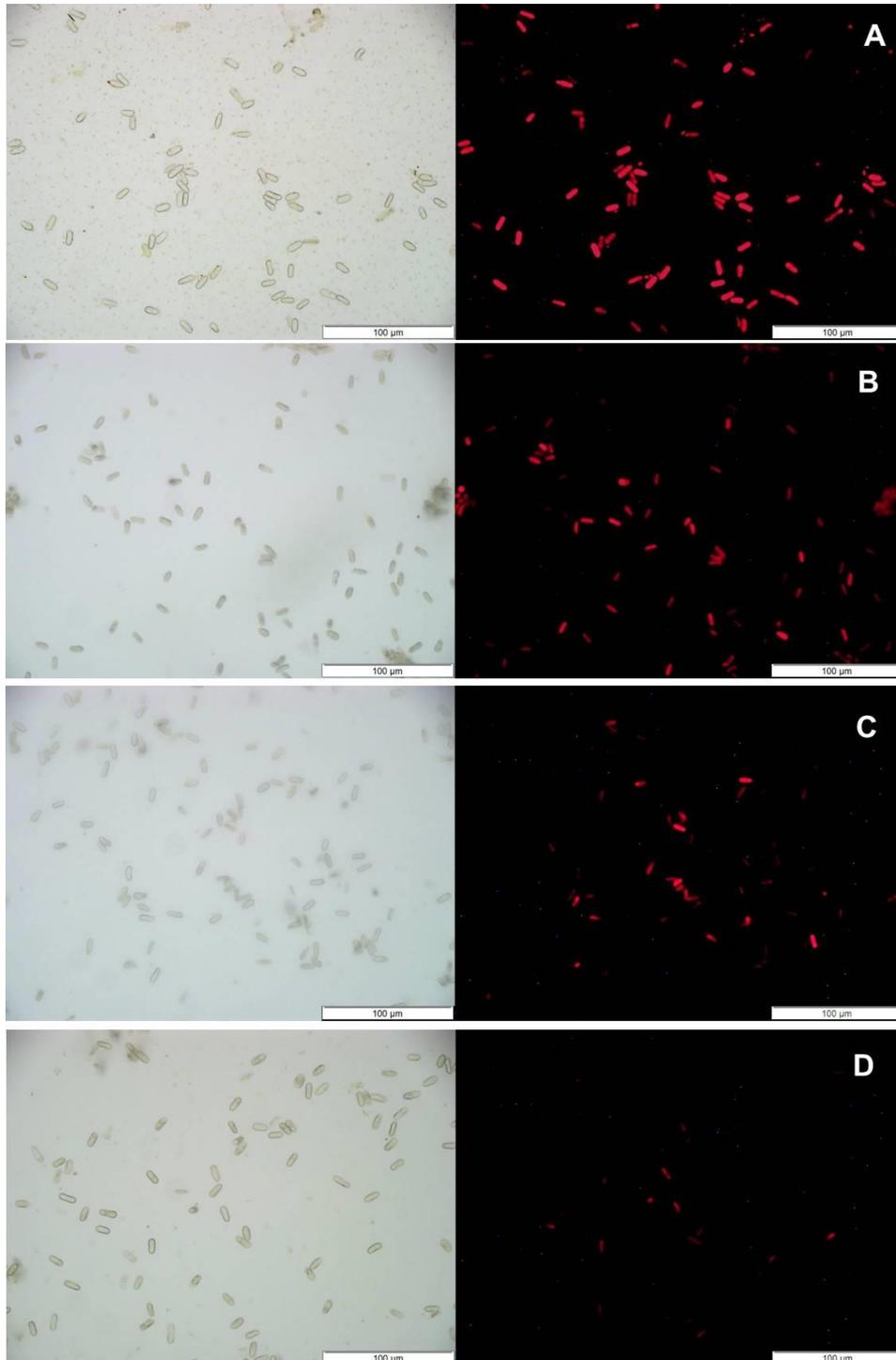
Nos campos à direita da FIGURA 24 pode ser visualizada a fluorescência decorrente da interação entre os conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e os derivados porfirínicos catiônicos. As porfirinas fluorescem na cor vermelha devido ao comprimento de onda da emissão luminosa proporcionado pela utilização do filtro Texas Red.

A fluorescência pode ser verificada em toda a extensão dos conídios e evidencia a internalização desses compostos pelas células. A localização exata das porfirinas não pode ser determinada a partir da análise realizada, uma vez que essa avaliou os conídios de forma global e não suas organelas especificamente.

Foi possível a avaliação da presença e a magnitude da fluorescência, onde a extensão se apresentou variável para os diferentes compostos e foi visualizada a partir da intensidade de fluorescência e da proporção dessa quando comparada com a microscopia realizada em campo claro.

A intensidade da fluorescência foi superior para os derivados monopiridilado e dipiridilados nas formas *cis* e *trans*. (FIGURA 24, A, B e C). Tal intensidade se mostrou consideravelmente inferior entre conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e Tri-Py⁺. (FIGURA 24, D). Esses dados são condizentes com aqueles obtidos para a avaliação por espectrofluorimetria, na qual um número inferior de moléculas de Tri-Py⁺ interagiu com os conídios do fitopatógeno do feijão.

FIGURA 24 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) NA PRESENÇA DE MONO-PY⁺, DI-TRANS-PY⁺, DI-CIS-PY⁺ E TRI-PY⁺.

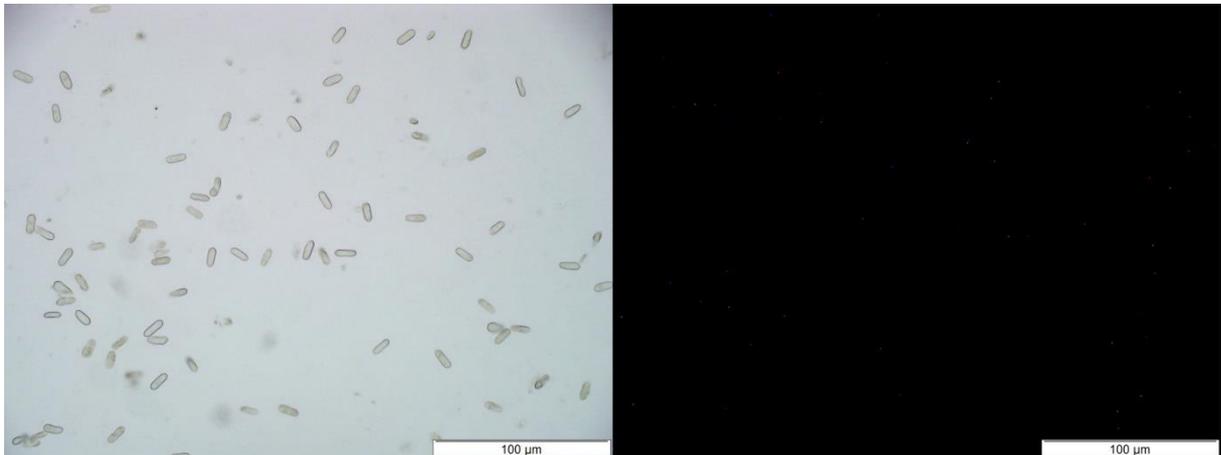


FONTE: O autor (2016).

NOTA: A: interação entre conídios e Mono-Py⁺; B: conídios e Di-trans.Py⁺; C: conídios e Di-cis.Py⁺; D: conídios e Tri.Py⁺. À esquerda está localizada a microscopia em campo claro, permitindo a visualização dos conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143). À direita se encontra a imagem do mesmo campo correlacionando a microscopia de fluorescência empregando filtro Texas Red. O aumento utilizado foi de 40 vezes e a concentração de derivados porfíricos de 10 µmol.L⁻¹.

Em relação à Tetra-Py⁺, na mesma concentração avaliada, não foi possível evidenciar a interação entre essa porfirina e o micro-organismo (FIGURA 25).

FIGURA 25 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) NA PRESENÇA DE TETRA-PY⁺



FONTE: O autor (2016).

NOTA: À esquerda está localizada a microscopia em campo claro, permitindo a visualização dos conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143). À direita se encontra a imagem do mesmo campo correlacionando a microscopia de fluorescência empregando filtro Texas Red. O aumento utilizado foi de 40 vezes e a concentração de derivado porfirínico de 10 µmol.L⁻¹.

Corroborando com os resultados obtidos na avaliação por espectrofluorimetria, esse derivado porfirínico mostrou menor interação com os conídios em relação a todos os outros compostos avaliados (FIGURA 21, p. 79).

Assim, foi avaliada uma concentração de 40,0 µmol.L⁻¹ para verificar a interação entre a porfirina tetracationizada e conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143). (FIGURA 26).

Com o emprego de uma concentração superior, pode ser observada a presença de fluorescência no campo em análise (FIGURA 26, direita). Porém, essa se apresenta com fraca intensidade, não permitindo a visualização concreta da interação entre esse derivado e os conídios do micro-organismo. Portanto, a eficiência fotodinâmica desse derivado foi inferior à observada para os demais, refletida pelo valor superior de CL50. Conforme descrito anteriormente, as mais elevadas fotoestabilidade e hidrossolubilidade contribuem para seus efeitos fotodinâmicos em relação a conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143).

FIGURA 26 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) NA PRESENÇA DE TETRA-PY⁺ EM MAIOR CONCENTRAÇÃO



FONTE: O autor (2016).

NOTA: À esquerda está localizada a microscopia em campo claro, permitindo a visualização dos conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143). À direita se encontra a imagem do mesmo campo correlacionando a microscopia de fluorescência empregando filtro Texas Red. O aumento utilizado foi de 40 vezes e uma concentração de derivado porfirínico de 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

4.5.2.2 Microscopia de fluorescência de porfirinas catiônicas e *Colletotrichum truncatum* (ERG133)

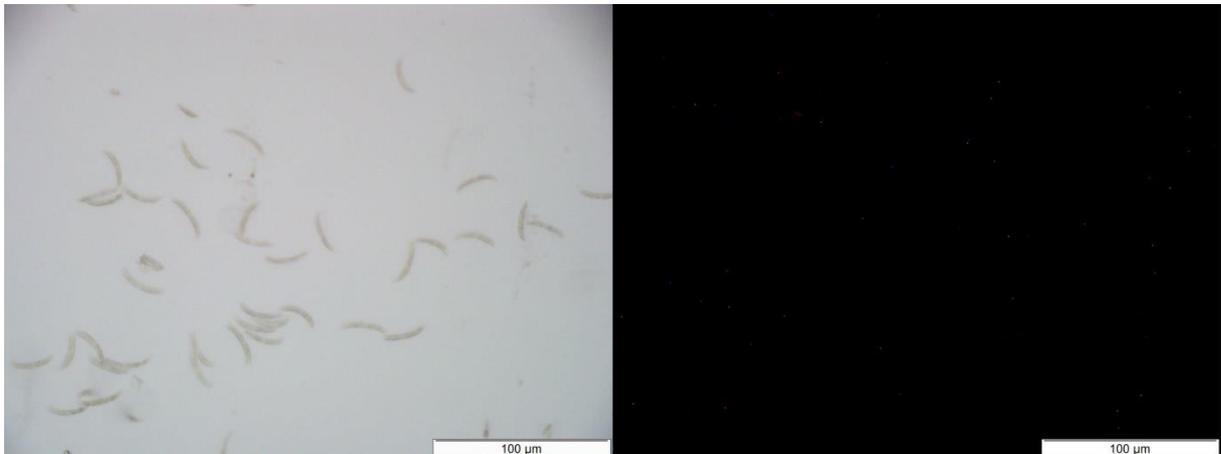
Da mesma maneira que para *Colletotrichum lindemuthianum* (1143), a interação entre as porfirinas foi avaliada microscopicamente para *Colletotrichum truncatum* (ERG 133).

A FIGURA 27 correlaciona a microscopia em campo claro (direita) e fluorescência (esquerda) para conídios de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) na ausência de porfirinas.

A partir da microscopia em campo claro (FIGURA 27, esquerda), pode ser visualizada a morfologia característica em forma de foice descrita para conídios hialinos e não-septados de *Colletotrichum truncatum*. (SHIVAPRAKASH et al., 2011).

Similarmente ao patógeno do feijão, não foi verificada fluorescência das estruturas dos conídios de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) na ausência de porfirinas (FIGURA 27, direita), indicando que qualquer fluorescência vermelha é proveniente de moléculas dos derivados porfirínicos.

FIGURA 27 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) NA AUSÊNCIA DE PORFIRINAS



FONTE: O autor (2016).

NOTA: À esquerda está localizada a microscopia em campo claro, permitindo a visualização dos conídios de *Colletotrichum truncatum* (ERG133). À direita se encontra a imagem do mesmo campo correlacionando a microscopia de fluorescência empregando filtro Texas Red. O aumento utilizado foi de 40 vezes.

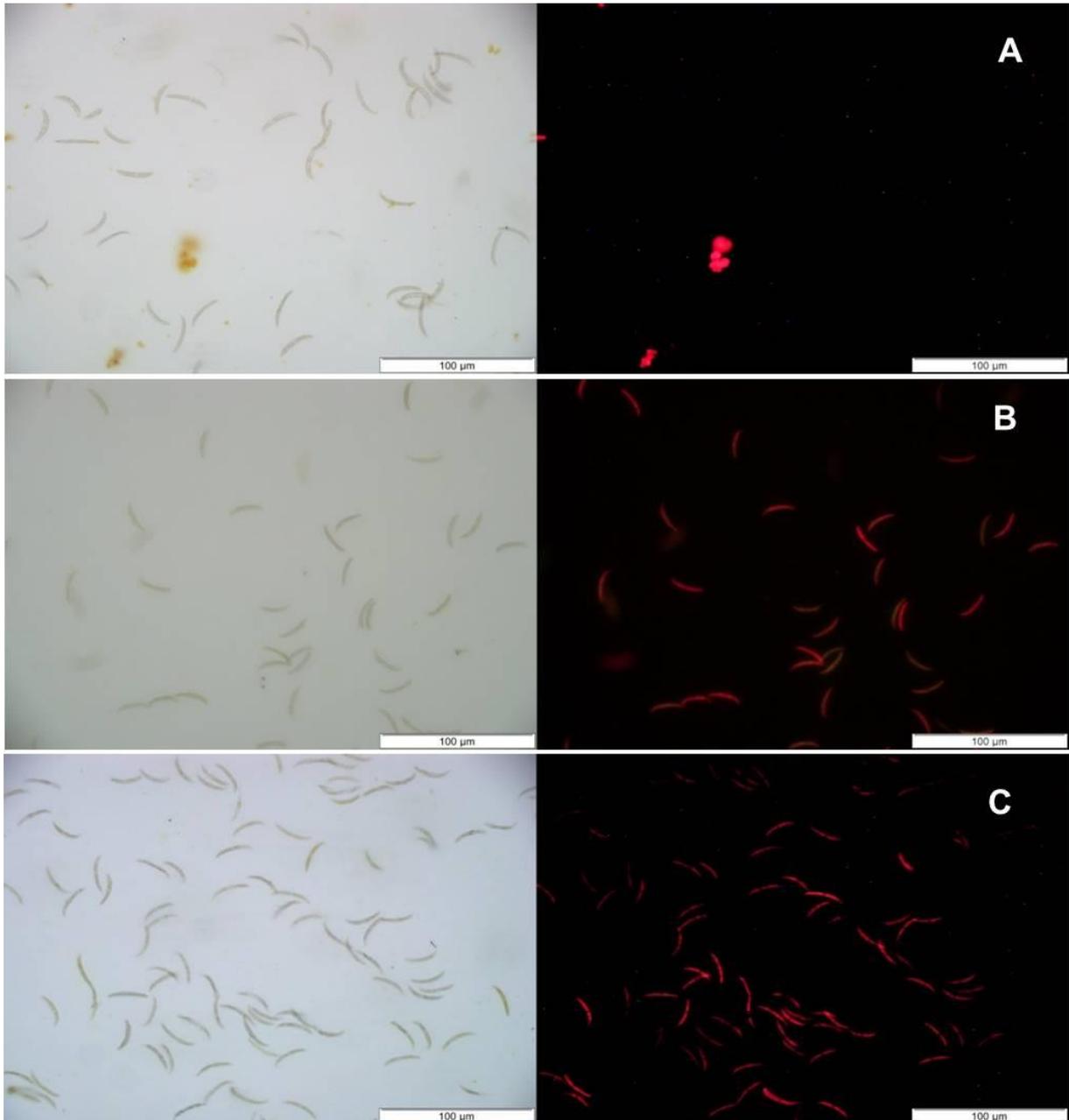
A FIGURA 28 (p. 91) e FIGURA 29 (p. 92) evidenciam a microscopia em campo claro (esquerda) e de fluorescência (direita) para conídios de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) na presença das porfirinas catiônicas Mono-Py⁺ (A), Di-*trans*-Py⁺ (B) e Di-*cis*-Py⁺ (C) (FIGURA 28), Tri-Py⁺ (D) e Tetra-Py⁺ (E). (FIGURA 29).

Para *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) foi possível, a partir do emprego da concentração de 10,0 µmol.L⁻¹, observar fluorescência para todas as porfirinas. As maiores intensidades foram observadas para: Mono-Py⁺, Di-*trans*-Py⁺ e Di-*cis*-Py⁺ (FIGURA 28, p. 91, A, B e C, respectivamente), que correspondem às porfirinas que interagem mais pronunciadamente com o fitopatógeno. (FIGURA 22, p. 82). Já Tri-Py⁺ e Tetra-Py⁺ mostraram uma fluorescência com intensidade inferior (FIGURA 29, p. 92, D e E), concordando, da mesma maneira, com a avaliação por espectrofluorimetria. (FIGURA 22, p. 82).

Ao contrário do observado para *Colletotrichum lindemuthianum* (1143), em relação à interação entre conídios de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) e Mono-Py⁺ não foi evidenciada internalização da porfirina pelo conídio. A partir da FIGURA 28 (A, direita) pode ser verificada ausência de interação, mesmo externa entre esse derivado mais hidrofóbico e o micro-organismo. De acordo com a comparação entre a microscopia em campo claro, a fluorescência das porfirinas corresponde a

agregados desse composto que ficaram presentes no campo de análise, não sendo possível evidenciar a presença dos conídios a partir do emprego da fluorescência.

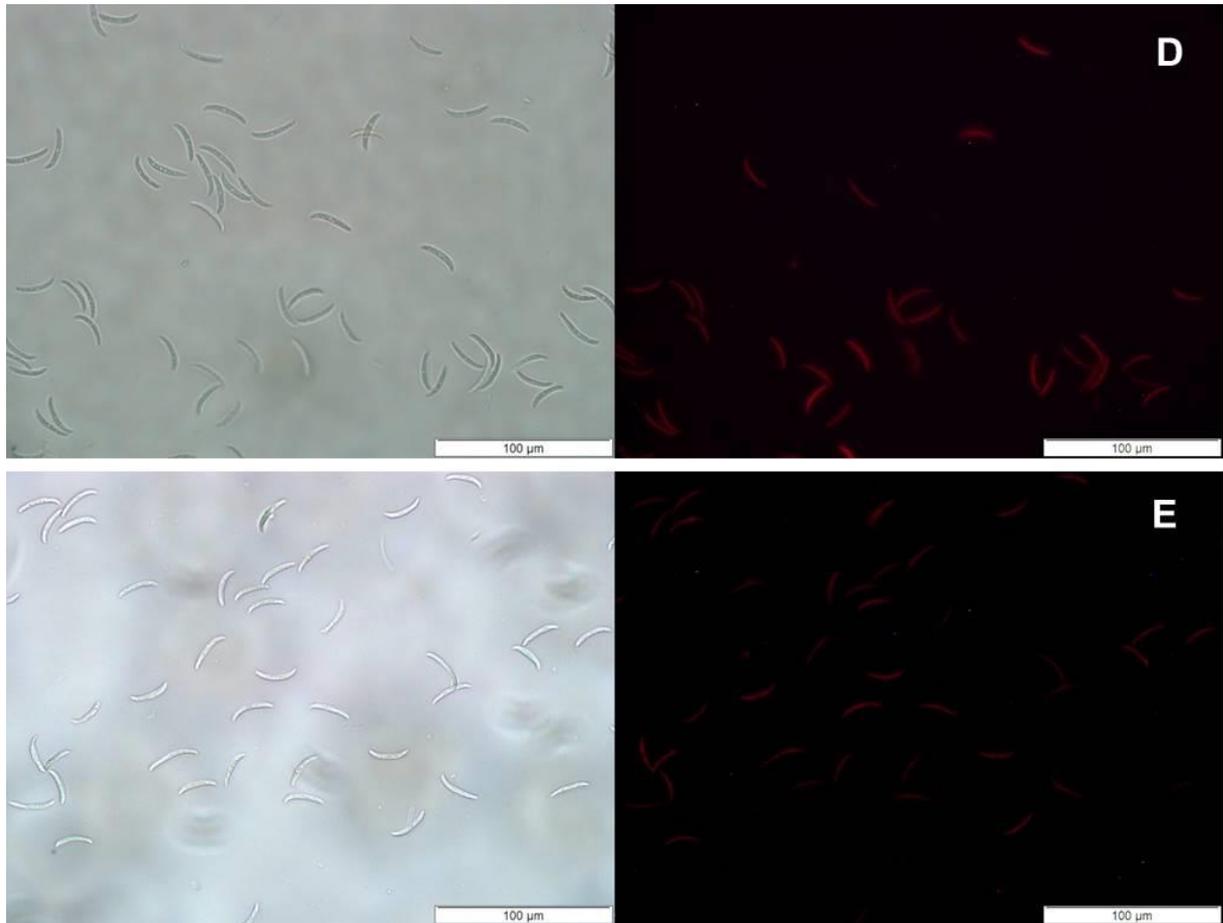
FIGURA 28 – MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) NA PRESENÇA DE MONO-PY⁺, DI-TRANS-PY⁺ E DI-CIS-PY⁺



FONTE: O autor (2016).

NOTA: A: interação entre conídios e Mono-Py⁺; B: conídios e Di-trans.Py⁺; C: conídios e Di-cis.Py⁺. À esquerda está localizada a microscopia em campo claro, permitindo a visualização dos conídios de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133). À direita se encontra a imagem do mesmo campo correlacionando a microscopia de fluorescência empregando filtro Texas Red. O aumento utilizado foi de 40 vezes e a concentração de derivados porfirínicos de 10 µmol.L⁻¹.

FIGURA 29– MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) NA PRESENÇA DE TRI-PY⁺ E TETRA PY⁺



FONTE: O autor (2016).

NOTA: A: interação entre conídios e Tri-Py⁺; B: conídios e Tetra.Py⁺. À esquerda está localizada a microscopia em campo claro, permitindo a visualização dos conídios de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133). À direita se encontra a imagem do mesmo campo correlacionando a microscopia de fluorescência empregando filtro Texas Red. O aumento utilizado foi de 40 vezes e a concentração de derivados porfirínicos de 10 µmol.L⁻¹.

A interação entre esses derivados hidrofóbicos e alvos biológicos foi relacionada por Gomes et al. (2011), onde os autores indicaram que essas porfirinas formam agregados. É importante ressaltar que para a avaliação microscópica, a concentração utilizada é superior à empregada para os testes de IFD e da avaliação por espectrofluorimetria e, nesse caso, em uma concentração superior em meio aquoso, essas porfirinas tendem a formar mais agregados. Por essa razão, embora não interagindo com os conídios, Mono-Py⁺ demonstrou eficiência similar à Tri-Py⁺ (CL50 de 0,41 e 0,39 µmol.L⁻¹, respectivamente) e superior à Tetra-Py⁺ (CL50 de 0,97 µmol.L⁻¹).

Para os demais derivados, Di-*trans*-Py⁺, Di-*cis*-Py⁺, Tri-Py⁺ e Tetra-Py⁺ (FIGURA 28, B e C, FIGURA 29, D e E, respectivamente) pode ser observada interação entre esses e conídios de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) de forma similar, para as quais é possível perceber a morfologia conidial na microscopia de fluorescência (direita), evidenciando internalização dessas porfirinas. Conforme mencionado anteriormente, a ordem da intensidade da fluorescência concordou com os dados obtidos nos estudos de espectrofluorimetria.

Assim como relatado para *Colletotrichum lindemuthianum* (1143), a partir das análises realizadas, as estruturas celulares que interagem diretamente com as porfirinas não podem ser determinadas, porém, a contato entre porfirinas catiônicas e alvos biológicos foi descrita na literatura. A interação entre Tetra-Py⁺ e membranas celulares foi relatada por Kawai et al. (2014), evidenciando que esses compostos carregados positivamente são capazes de interagir com membranas biológicas a partir de interações eletrostáticas. Além da membrana plasmática, as porfirinas podem interagir com o DNA, como relatado na IFD de *Escherichia coli* com Tetra-Py⁺. (ALVES et al., 2013). De maneira semelhante, interações dessa porfirina com oligonucleotídeos foi relatada por Choudhury et al. (2014).

A magnitude da interação entre fotossensibilizadores e alvos biológicos para IFD contribuem para a avaliação dos efeitos desse procedimento. Aliadas a parâmetros já descritos na literatura (VANDRESEN et al., 2016), como fotoestabilidade (TABELA 1, p. 42) e capacidade de geração de espécies reativas, como oxigênio singlete (TABELA 2, p. 43) permitem a correlação da efetividade de porfirinas na IFD.

4.6 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

Diversos fatores físicos e químicos são capazes de interferir na atividade fotodinâmica inativadora. Dentre os fatores interferentes estão constam o pico e intensidade de absorção e rendimento de oxigênio singlete.

Além da importante geração da espécie reativa oxigênio singlete (TABELA 2, p. 43) (VANDRESEN et al., 2016), são relacionados outros fatores que contribuem com o efeito fotodinâmico, como o coeficiente de partição óleo-água, grau de ionização e presença de grupos carregados (CALZAVARA-PINTON; VETURINI; SALA, 2005). Segundo os autores, a presença desses grupos interfere com a

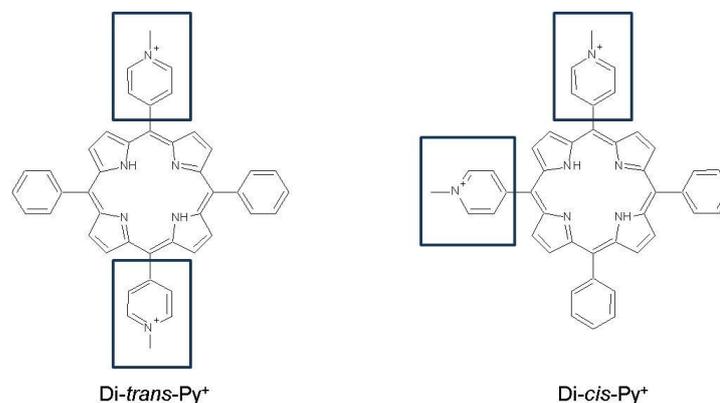
internalização do fotossensibilizador e o padrão de distribuição entre os compartimentos celulares. Além disso, de acordo com Engelmann et al. (2007), a ligação à membrana celular consiste em um importante aspecto a ser considerado na avaliação da efetividade da IFD e seu estudo está diretamente relacionado à estrutura química do composto utilizado.

A estrutura química dos fotossensibilizadores reflete diretamente nas propriedades fotodinâmicas atribuídas a esses compostos. Os resultados obtidos para a IFD de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) evidenciam que pode ser observada influência do número de cargas positivas e sua posição da eficiência do fotossensibilizador. É importante ressaltar que serão relacionados abaixo, com fins de comparação, os valores obtidos para CL50, pois os determinados para CL90 mostram a mesma ordem numérica observada para CL50 em relação aos diferentes derivados porfirínicos.

Ambas as porfirinas dicationizadas apresentaram a maior eficiência na inativação de conídios de ambos os fungos filamentosos. Dentre essas, Di-*cis*-Py⁺ mostrou ser mais eficiente, com uma CL50 de 0,24 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e 0,10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) em comparação com os valores de 0,52 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 0,28 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ mostrados por Di-*trans*-Py⁺ para os micro-organismos, respectivamente. Para porfirina dicationizada na forma *trans*, a CL50 se mostrou superior a duas vezes o valor observado para Di-*cis*-Py⁺ para ambos os fitopatógenos em estudo.

A diferença estrutural entre esses compostos reside na posição da carga positiva (FIGURA 30).

FIGURA 30 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS PORFIRINAS DIPIRIDILADAS E SUAS DIFERENÇAS



FONTE: Adaptado de VANDRESEN (2013).

No composto Di-*trans*-Py⁺ (FIGURA 30, esquerda) as cargas positivas são localizadas em posições *meso* opostas. Por sua vez, a porfirina Di-*cis*-Py⁺ apresenta cargas positivas em posições *meso* vicinais (FIGURA 30, direita). Essa diferença confere ao derivado Di-*cis*-Py⁺ maior polaridade, visto que esse composto demonstra assimetria molecular. As duas cargas positivas em Di-*cis*-Py⁺ podem gerar uma repulsão eletrostática (ALVES et al., 2009), o que não ocorre para a porfirina Di-*trans*-Py⁺, molécula com maior simetria molecular.

A diferença nas atividades da IFD mostrada por dois derivados porfirínicos isômeros *meso*-substituídos contendo duas cargas positivas foi anteriormente descrita (ALVES et al., 2009; KESSEL; LUGUYA; VICENTE, 2003; SIMÕES et al., 2016; VANDRESEN et al., 2016). Assim como em relação a conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133), os estudos evidenciaram atividade superior na IFD para aqueles compostos com duas cargas positivas em posições *meso* vicinais. Em avaliação anterior empregando os mesmos derivados em conídios de *Colletotrichum graminicola*, Vandresen et al. (2016) observaram que, com uma concentração de 1,0 µmol.L⁻¹, Di-*trans*-Py⁺ foi um eficiente fotossensibilizador, já Di-*cis*-Py⁺ exibiu efeito fungicida, pois nessa concentração ocasionou morte celular do fitopatógeno mesmo na ausência de iluminação.

A eficiência desigual desses isômeros foi relacionada na literatura a diferenças na hidrofobicidade dos compostos, distribuição de cargas ou ambos (KESSEL; LUGUYA; VICENTE, 2003). Os autores indicam que tais fatores estão diretamente relacionados à afinidade das porfirinas por sítios celulares distintos, o que resulta em atividades fotodinâmicas diversas.

A eficiência dos derivados Mono-Py⁺ e Tri-Py⁺ foram similares quando comparados os valores de CL50 para ambos os fitopatógenos (TABELA 7, p. 75 e TABELA 8, p. 77). Porfirinas catiônicas contendo três cargas positivas foram relacionadas como eficientes na inativação de bactérias Gram positivas e Gram negativas (ALVES et al., 2009; SIMÕES et al., 2016), leveduras (CORMICK et al., 2009) e fitopatógenos (VANDRESEN et al., 2016). Já aqueles derivados porfirínicos monocationizados demonstraram menor eficiência quando comparados àqueles com maior número de cargas positivas (ALVES et al., 2009; SIMÕES et al., 2016; VANDRESEN et al. 2016).

A eficiência de Mono-Py⁺ comparável à Tri-Py⁺ no presente estudo pode se relacionar ao fato dos compostos monocationizados predominantemente hidrofóbicos demonstrarem como sítio alvo a membrana plasmática (KESSEL, 2002), contribuindo para os danos fotodinâmicos relatados. Nesse caso, a interação superior demonstrada entre Mono-Py⁺ e conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) contribui para os seus efeitos fotodinâmicos. Mesmo que essa interação ocorra extracelularmente no caso de *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) (FIGURA 28, p. 91), essa foi quantitativamente equivalente à observada para conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) no ensaio em espectrofluorímetro (FIGURA 21, p. 79 e FIGURA 22, p. 82) e consideravelmente superior à evidenciada para Tri-Py⁺.

Com referência ao derivado tricationizado, considerando que o meio de análise, assim como os meios biológicos, é aquoso, a maior hidrossolubilidade dessa porfirina, devido à presença de um número maior de cargas positivas em sua estrutura química favorece suas atividades fotodinâmicas. Além disso, a elevada fotoestabilidade atribuída a esse derivado (TABELA 1, p. 42) representa um fator que contribui para sua eficiência.

A porfirina Tetra-Py⁺, relacionada na literatura em IFD (REDDI et al., 2002; LAMBRECHTS; AALDERS; VAN MARLE, 2005; GOMES et al., 2011; KOMAGOE et al., 2011; QUIROGA et al., 2012; VANDRESEN et al., 2016) demonstrou a maior CL50 dentre os cinco derivados avaliados para ambos os fitopatógenos, com valores próximos a 1,0 µmol.L⁻¹. Na literatura, assim como para os derivados testados com três cargas positivas, aqueles que contêm quatro, juntamente com os anteriores, são relatados como os mais eficientes fotossensibilizadores (ALVES et al., 2009; SIMÕES et al., 2016). Porém, os resultados obtidos em relação à Tetra-Py⁺ para conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133) foram semelhantes aos observados para *Colletotrichum graminicola* (VANDRESEN et al., 2016), refletidos pela ordem na eficiência fotodinâmica dos derivados em conídios das espécies que atingem feijão e soja. A exceção consistiu em Mono-Py⁺, que demonstrou eficiência inferior à Tetra-Py⁺ em conídios de *Colletotrichum graminicola*, e consideravelmente superior para conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133). As diferenças podem ser atribuídas a uma redução na concentração de Mono-Py⁺ com consequente diminuição do fenômeno da agregação em meio aquoso.

Comparando todos os derivados, embora Tetra-Py⁺ tenha demonstrado o maior valor de CL50, esse ainda se mostra inferior a 2,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Por essa razão, a IFD *in vitro* promovida por essas porfirinas foi eficiente na inativação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* (1143) e *Colletotrichum truncatum* (ERG 133).

A avaliação da IFD *in vitro* empregando porfirinas catiônicas mostrou a eficiência do processo na inativação *in vitro* de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum*. Esses resultados encorajam a realização de estudos *in vivo* com o intuito de verificar a eficiência da IFD na inativação dos fitopatógenos quando já estabelecido o processo infeccioso nos respectivos hospedeiros.

5 CONCLUSÃO

A pesquisa dessa tese permite elencar as seguintes conclusões

– A IFD *in vitro* empregando cinco porfirinas catiônicas proporcionou inativação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum*. No presente estudo, o efeito fotodinâmico da inativação dos fitopatógenos foi comprovado a partir da visualização da morte dos microorganismos apenas na presença dos três componentes da IFD: luz, porfirina catiônica e oxigênio. O emprego apenas de iluminação (controle claro) ou porfirinas catiônicas no escuro (controle escuro) não ocasionou redução da viabilidade dos conídios em níveis significativos.

– Para os cinco derivados porfirínicos catiônicos avaliados e ambos os fitopatógenos, os valores de CL50 foram inferiores a $1,24 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e os valores de CL90 menores que $2,47 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Com exceção de Tetra-Py⁺, na IFD empregando os demais derivados porfirínicos estruturalmente relacionados, foram observados valores inferiores de CL50 e CL90 em relação à *Colletotrichum truncatum* (ERG133) quando comparados aos obtidos para *Colletotrichum lindemuthianum* (1143). A porfirina que mostrou os menores valores de CL50 e CL90 para ambos os microorganismos foi Di-*cis*-Py⁺ (0,10 e 0,22 para *Colletotrichum truncatum* ERG 133 e 0,24 e 0,36 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para *Colletotrichum lindemuthianum* 1143, respectivamente).

– Os ensaios de interação evidenciaram que, para as espécies de *Colletotrichum* spp. em estudo, os derivados porfirínicos dicationizados (Di-*cis*-Py⁺ e Di-*trans*-Py⁺), assim como Mono-Py⁺ interagiram de maneira mais expressiva com conídios dos fitopatógenos. Ao contrário, a interação entre os derivados e os microorganismos se mostrou inferior com Tri-Py⁺ e Tetra-Py⁺. Os resultados observados por microscopia de fluorescência confirmaram a interação existente entre os conídios dos fitopatógenos e os derivados porfirínicos verificada no ensaio de espectrofluorimetria.

– A eficiência dos derivados porfirínicos catiônicos estruturalmente relacionados na IFD de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* 1143 e *Colletotrichum truncatum* ERG 133 obedeceu à seguinte ordem: Di-*cis*-Py⁺ < Di-*trans*-Py⁺ < Tri-Py⁺ < Mono-Py⁺ < Tetra-Py⁺. As variações observadas foram relacionadas a diferenças presentes nas estruturas químicas das porfirinas, onde o

número e à posição das cargas positivas nas moléculas interferiram diretamente na eficiência das porfirinas, especialmente por afetar a interação existente entre os essas e os micro-organismos.

As porfirinas catiônicas contendo duas cargas positivas foram as que mostraram a maior eficiência na inativação dos conídios dos fungos filamentosos, que concorda com a superior interação entre os derivados e *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum*. Já as porfirinas contendo número superior de cargas positivas evidenciaram menor eficiência, confirmada pela menor interação com os derivados. O derivado porfirínico contendo uma carga positiva, mostrou eficiência superior apenas à porfirina tetracationizada. Além das modificações nos níveis de interação, a literatura evidencia que as diferentes estruturas químicas das porfirinas refletem em distintas localizações dessas nas células assim como em variáveis propriedades fotofísicas, que interferem diretamente na eficiência fotodinâmica dos derivados. (KESSEL, 2002; SIMÕES et al., 2016, VANDRESEN et al. 2016).

Os resultados do presente estudo confirmam a eficiência das porfirinas catiônicas na inativação fotodinâmica *in vitro* de micro-organismos. A efetiva morte celular dos fitopatógenos *in vitro* torna factível a realização de estudos *in vivo* para verificar a eficiência desses derivados como auxiliares no tratamento de doenças vegetais como a antracnose, que são causadoras de intensos prejuízos econômicos no Brasil e no mundo.

REFERÊNCIAS

- AGROLINK. **Antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*)**. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/antracnose_1547.html>. Acesso em: 22 out. 2016.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja (*Glicine max*). In: KIMATI, H. et al., 2005. **Manual de Fitopatologia**, v.2: Doenças das Plantas Cultivadas, 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005.
- ALMEIDA, L. M.; et al. Cell survival and altered gene expression following photodynamic inactivation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 4, p. 992–1000, 2012.
- ALMEIDA-LOPES, L. **Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa intensidade utilizando diferentes parâmetros de irradiação**. 189 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Interunidades em Ciência e Tecnologia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- ALVES, E. et al. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic *meso*-substituted porphyrins. **BMC microbiology**, v. 9, p. 70, 2009.
- ALVES, E.; et al. Nucleic acid changes during photodynamic inactivation of bacteria by cationic porphyrins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 14, p. 4311–4318, 2013.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN-FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**., v. 1: Princípios e Conceitos. 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2011.
- ARMSTRONG-CHO, C.; et al. The infection process of two pathogenic races of *Colletotrichum truncatum* on lentil. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 58–67, 2012.
- ARUNKUMAR, E.; et al. Singlet oxygen generation using iodinated squaraine and squaraine-rotaxane dyes. **New journal of chemistry = Nouveau journal de chimie**, v. 31, n. 5, p. 677–683, 2007.
- ATCC. American Type Culture Collection. Disponível em: <www.atcc.org>. Acesso em: 13/03/2013.
- AWAD, M. M.; TOVMASYAN, A.; CRAIK, J. D.; BATINIC-HABERLE, I.; BENOVA, L. T. Important cellular targets for antimicrobial photodynamic therapy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 17, p. 7679–7688, 2016.
- BACKMAN, P. A.; WILLIAMS, J. C.; CRAWFORD, M. A. Yield losses in soybeans from Anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, v. 6, n. 11, 1982.

BALARDIN, R. S.; JAROSZ, A. M.; KELLY, J. D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central, and North America. **Phytopathology**, v. 87, n. 12, p. 1184–1191, 1997.

BARCELOS, Q. L.; SOUZA, E. A.; DAMASCENO E SILVA, K. J. Vegetative compatibility and genetic analysis of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Brazil. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 10, n. 1, p. 230–242, 2011.

BASAVARAJU, P.; et al. Infection biology and defence responses in sorghum against *Colletotrichum sublineolum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 404–415, 2009.

BASHIR, M.; et al. Control of mungbean anthracnose by foliar fungicides. **Pakistan Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 3, p. 173–175, 1985.

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (BD). **Difco® & BBL® Manual**: Manual of Microbiological Culture Media. 2 ed. BD Diagnostics – Diagnostic Systems: Sparks, 2009. Disponível em: <
http://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcobblmanual_2nded_lowres.pdf >. Acesso em: 19 out. 2016.

BEGUM, M. M.; et al. Field performance of bio-primed seeds to suppress *Colletotrichum truncatum* causing damping-off and seedling stand of soybean. **Biological Control**, v. 53, n. 1, p. 18–23, 2010.

BEIRÃO, S.; et al. Photodynamic inactivation of bacterial and yeast biofilms with a cationic porphyrin. **Photochemistry and photobiology**, v. 90, n. 6, p. 1387–1396, 2014.

BENHAMOU, N. et al. Cell surface interactions between bean leaf cells and *Colletotrichum lindemuthianum* - cytochemical aspects of pectin breakdown and fungal endopolygalacturonase accumulation. **Plant Physiology**, v. 97, p. 234–244, 1991.

BEVERINA, L. et al. New π -extended water-soluble squaraines as singlet oxygen generators. **Organic Letters**, v. 7, n. 19, p. 4257–4260, 2005.

BHADAURIA, V.; et al. EST mining identifies proteins putatively secreted by the anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 327, 2011.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T.P.G. Doenças do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). In: KIMATI, H. et al., 2005. **Manual de Fitopatologia**, v.2: Doenças das Plantas Cultivadas, 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005.

BIGIRIMANA, J.; HÖFTE, M. Bean anthracnose: Inoculation methods and influence of plant stage on resistance of *Phaseolus vulgaris* cultivars. **Journal of Phytopathology**, v. 149, n. 7-8, p. 403–408, 2001.

BONNETT, R.; MARTÍNEZ, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 57, n. 591, p. 9513–9547, 2001.

BOSSINI, P.S. **Laser de baixa intensidade (670 nm) na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos**. 132 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

BRAND, S. C.; et al. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1881–1887, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Diretrizes e exigências referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasil, DF, n. 242, 13 dez. 1991, seção 1, p. 48. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=48&data=13/12/1991>>. Acesso em: 02 nov. 2016.

BRASIL. Medida Provisória n. 2186-16, de 23 de agosto de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, v.163, 24 ago. 2001. Sessão 1, p. 11. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=11&data=24/08/2001>> Acesso em: 20/01/2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 20, de 29 de junho de 2006. Estabelece procedimentos para remessa de amostra de componente do patrimônio genético existente em condição *in situ*, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, mantida em condição *ex situ*, para o desenvolvimento de pesquisa científica sem potencial de uso econômico. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasil, DF, n. 143, 27 jul. 2006, seção 1, p. 96. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/222/_arquivos/res20_dou_222.pdf>. Acesso em: 20 mar 2013.

BRASIL. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Extratos de Acordo de Transferência de Material. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasil, DF, n. 153, 9 ago. 2013, seção 3, p. 9.

BRASIL. **Ministério do meio ambiente**. Patrimônio genético, 2014. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/patrimonio-genetico/conselho-de-gestao-do-patrimonio-genetico>>. Acesso em: 20/01/2014.

BRASIL. Atos do Poder Legislativo. Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015. Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição Federal, o Artigo 1, a alínea j do Artigo 8, a alínea c do Artigo 10, o Artigo 15 e os §§ 3º e 4º do Artigo 16 da Convenção sobre Diversidade Biológica, promulgada pelo Decreto no 2.519, de 16 de março de 1998; dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade;

revoga a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001; e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasil, DF, ano CLII, n. 95, 21 mai. 2015, seção 1, p. 1. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=1&data=21/05/2015>>. Acesso em: 12 dez. 2016.

BRASIL. (BRASIL, 2016a). **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 29 out. 2016.

BRASIL. (BRASIL, 2016b). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agrofit. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 08 out. 2016.

BRASLAVSKY, S. E. Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006). **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 293–465, 2007.

BROUGHTON, W. J.; et al. Beans (*Phaseolus* spp.) - Model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55–128, 2003.

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, n. 1, p. 1–6, 2005.

CAMINOS, D. A.; DURANTINI, E. N. Interaction and photodynamic activity of cationic porphyrin derivatives bearing different patterns of charge distribution with GMP and DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 198, n. 2-3, p. 274-281, 2008.

CANNON, P. F.; et al. *Colletotrichum* - current status and future directions. **Studies in Micology**, v. 73, p. 181–213, 2012.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. Photochemistry. In:_____. **Advanced Organic Chemistry: part A: Structure and Mechanisms**. New York: Springer, 2007. p. 1073-1156.

CARRÉ, V. et al. Fungicidal properties of *meso*-arylglycosylporphyrins : influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 48, p. 57–62, 1999.

CASTANO, A.; DEMIDOVA, T.; HAMBLIN, M. Mechanisms in photodynamic therapy: part one: photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.

ČEKLOVSKÝ, A. **Spectral properties of porphyrins in the systems with layered silicates**. 81 p. Thesis (Doctoral dissertation) - Department of Hydrosilicates, Slovak Academy of Sciences, 2009. Disponível em: <http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/40/100/40100338.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2016.

CHEN, B., et al. Synthesis of some multi- β -substituted cationic porphyrins and studies on their interaction with DNA. **Tetrahedron**, v. 62, n. 23, p. 5487-5497, 2006

CHIORATO, A. F.; et al. Co-evolução entre raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e feijoeiro. **Bragantia**, v. 65, n. 3, p. 381–388, 2006.

CHOUDHURY, S. D.; et al. Interaction of meso-tetrakis (N-methylpyridinyl) porphyrin with single strand DNAs – poly (dA), poly (dT), poly (dG) and poly (dC): A photophysical study. **Journal of Chemical Sciences**, v. 126, n. 4, p. 911–917, 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Conjuntura Agropecuária do Feijão**. Brasília, 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_07_09_16_20_14_conjuntura_agropecuaria_do_feijao_-_junho_2015.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da Safra brasileira: grãos – safra 2016-2017**. 1º levantamento, n. 1, Brasília, 2016.

CORMICK, M. P. et al. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1592–9, 2009. Elsevier Masson SAS.

COSTA, L.; et al. Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of aPDT. **Antiviral Research**, v. 91, n. 3, p. 278–282, 2011.

COSTA, L. et al. Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. **Viruses**, v. 4, n. 7, p. 1034–74, 2012.

DAMASCENO E SILVA, K. J. D.; DE SOUZA, E. A.; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* Isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 4, p. 241–247, 2007.

DETTY, M. R.; MERKEL, P. B. Chalcogenapyrylium dyes as potential photochemotherapeutic agents. Solution studies of heavy atom effects on triplet yields, quantum efficiencies of singlet oxygen generation, rates of reaction with singlet oxygen, and emission quantum yields. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 10, p. 3845-3855, 1990.

DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 18–23, 2016.

DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 1–12, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). Embrapa Milho e Sorgo. **Circular técnica n°120**: Efeito da podridão de colmo, causada por *Colletotrichum graminicola*, na produção da cultura do milho. Sete Lagoas: 2009. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2009/circular/Circ_120.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2014.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de Produção de Soja na Região Central do Brasil**, Londrina, 2013. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/975595/tecnologias-de-producao-de-soja---regiao-central-do-brasil-2014>>. Acesso em: 05 nov. 2016.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja na alimentação**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/soja-na-alimentacao>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

ENGELMANN, F.; et al. Determination of *n*-octanol/water partition and membrane binding of cationic porphyrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 12–18, 2007.

FEDERICI, L. et al. Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGI_P (polygalacturonase-inhibiting protein). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 23, p. 13425-13430, 2001. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/98/23/13425.full.pdf>>. Acesso em: 04 dez. 2016.

FELBER, T. D., et al. Photodynamic inactivation of herpes simplex. **The Journal of American Medical Association**, v. 223, n. 3, p. 289-292, 1973.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **BAM: Aerobic Plate Count**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>>. Acesso em: 25 out. 2016.

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

GAD, F.; et al. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2173–8, 2004.

GAENSLY, F. **Seleção de leveduras vínicas autóctones produtoras da enzima β -glicosidase em mosto de uvas *Vitis labrusca* visando o aumento do teor de resveratrol livre**. 2016. 133f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

GARCIA, A.; et al. Influência das variáveis ambientais no progresso da antracnose do feijoeiro e eficiência de Tiofanato metílico + Clorotalonil no controle da doença. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1709–1715, 2007.

GILLARD, C. L.; RANATUNGA, N. K. Interaction between seed treatments, surfactants and foliar fungicides on controlling dry bean anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). **Crop Protection**, v. 45, p. 22–28, 2013.

GOMES, M. C.; et al. Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 10, n. 11, p. 1735–43, 2011.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; et al. Allelic relationships of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) resistance in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Michelite and the proposal of a new anthracnose resistance gene, Co-11. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 589–593, 2007.

GOSSEN, B. D.; ANDERSON, K. L.; BUCHWALDT, L. Host specificity of *Colletotrichum truncatum* from lentil. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 31, n. 1, p. 65-73, 2009.

GOULART, A. C. P. **Deteção e Controle Químico de Colletotrichum em Sementes de Soja e Algodão**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2009.

GOUTERMAN, M. Spectra of porphyrins. **Journal of Molecular Spectroscopy**, v. 6, p. 138–163, 1961.

GOUTERMAN, M.; WAGNIÈRE, G. H.; SNYDER, L. C. Spectra of porphyrins: Part II. Four orbital model. **Journal of Molecular Spectroscopy**, v. 11, n. 1-6, p. 108-127, 1963.

GRELLIER, P., et al. Photosensitized inactivation of *Plasmodium falciparum*- and *Babesia divergens*-infected erythrocytes in whole blood by lipophilic pheophorbide derivatives. **Vox Sanguinis**, v. 72, n. 4, p. 211-220, 1997.

HENNING, A. A.; MANUEL, Á.; ALMEIDA, R.; et al. **Manual de identificação de Doenças de Soja**. Londrina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2005.

HERNÁNDEZ-SILVA, L. et al. Comparison of fungal growth and production of extracellular pectin lyase activity by pathogenic and non-pathogenic races of *Colletotrichum lindemuthianum* cultivated under different conditions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 70, p. 88–95, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS RENOVÁVEIS.(IBAMA). **Portaria nº 84, de 15 de outubro de 1996**. Estabelece procedimentos a serem adotados junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental - (ppa) de agrotóxicos, seus componentes e afins, segundo definições dispostas nos incisos XX, XXI, XXII, do artigo 2º, do Decreto nº 98.816. Disponível em:

<https://servicos.ibama.gov.br/phocadownload/legislacao/portaria_84.pdf>. Acesso em: 02 nov.2016.

INDEX FUNGORUM, 2016. Disponível em: < <http://www.indexfungorum.org>>. Acesso em: 02 nov. 2016.

JORI, G.; BROWN, S. B. Photosensitized inactivation of microorganisms. **Photochemistry & Photobiological Sciences**, v. 3, p. 403–405, 2004.

JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections : state of the art and perspectives. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, v. 25, n. 1-2, p. 505–519, 2006.

JORI, G. et al. **Antimicrobial Photodynamic Therapy : Basic Principles**. In: HAMBLIN, M. R.; JORI, G. Photodynamic inactivation of microbial pathogens: medical and environmental applications, p.1–18, 2011.

KASSAB, K., et al. Phthalocyanine-photosensitized inactivation of a pathogenic protozoan, *Acanthamoeba palestinensis*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 2, n. 6, p. 668-672, 2003.

KAWAI, C.; et al. Photodamage in a mitochondrial membrane model modulated by the topology of cationic and anionic *meso*-tetrakis porphyrin free bases. **Photochemistry and Photobiology**, v. 90, n. 3, p. 596–608, 2014.

KESSEL, D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 11, p. 837–840, 2002.

KESSEL, D.; LUGUYA, R.; VICENTE, M. G. H. Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distributions. **Photochemistry and photobiology**, v. 78, n. 5, p. 431–435, 2003.

KIMATI, H. et al., 2005. **Manual de Fitopatologia**, v.2: Doenças das plantas cultivadas, 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005.

KOMAGOE, K. et al. Continuous real-time monitoring of cationic porphyrin-induced photodynamic inactivation of bacterial membrane functions using electrochemical sensors. **Photochemical & Protobiological Sciences**, v. 10, n. 7, p. 1181–1188, 2011.

KUMAR, S.; SINGH, V.; GARG, R. Original research article cultural and morphological variability in *colletotrichum capsici* causing anthracnose disease. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 2, p. 243–250, 2015.

LAMBRECHTS, S. A G.; AALDERS, M. C. G.; VAN MARLE, J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 2026–34, 2005.

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

LENNÉ, J. M.; SONODA, R. M.; PARBERY, D. G. Production of conidia by setae of *Colletotrichum* species. **Mycologia**, v. 76, n. 2, p. 359–362, 1984.

LIMA, P. R. DE A.; et al. Eficiência de fungicidas no controle da antracnose e da mancha angular do feijoeiro comum. **Cerrado Agrociências**, v. 1, p. 54–59, 2010.

LUMACARE®. **LumaCare Lamp Model LC-122**. Disponível em: <<http://www.lumacare.com/lumacare-lamp-model-lc-122/>>. Acesso em: 19 set. 2016.

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

MANDARINO, J. M. G; CARRÃO-PANIZZI, M. C. **Soja na Alimentação**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2016. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONT000fv0xofuo02wx5eo0c9slraa4ux9qv.html>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

MATSUMOTO, J., et al. Water-soluble phosphorus porphyrins with high activity for visible light-assisted inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 218, n. 1, p. 178-184, 2011.

MENEZES E SILVA, C. H. P. D., et al. **Bacteriologia e Micologia para o Laboratório Clínico**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

MENEZES, H. D.; et al. Furocoumarins and coumarins photoinactivate *Colletotrichum acutatum* and *Aspergillus nidulans* fungi under solar radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 131, p. 74–83, 2014a.

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, 2014b.

MENG, S.; et al. Synthesis, characterization and *in vitro* photodynamic antimicrobial activity of basic amino acid–porphyrin conjugates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 35–48, 2015.

MESQUITA, F. R. et al. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1114-1121, 2007.

MILGROM, L. R. **The colours of life: an introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds**. Oxford University Press, New York, 1997.

MITRA, S. et al. Effective photosensitization and selectivity *in vivo* of *Candida albicans* by meso-tetra(*N*-methyl-4-pyridyl) porphine tetra tosylate. **Lasers in surgery and medicine**, v. 43, n. 4, p. 324–332, 2011.

MURPHY, D. B. **Microscopy and Electronic Imaging**. USA: Wiley-Liss, 2001.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, p. 1–18, 1997.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, v. 27, n. 1, p. 75-98, 1985.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3 ed ed.São Paulo: Atheneu, 2008.

PELOI, L. S., et al. Photodynamic therapy for american cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, 2011.

PEREIRA, C. E.; et al. Tratamento fungicida de sementes de soja inoculadas com *Colletotrichum truncatum*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 1–6, 2009.

PERFECT, S. E.; et al. *Colletotrichum* : a model genus for studies on pathology and fungal – plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 198, p. 186–198, 1999.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de micro-organismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988–994, 2007.

PHOTITA, W.; et al. Morphological and molecular characterization *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand of. **Fungal Diversity**, v. 18, p. 117–133, 2005.

QUIROGA, E. D.; et al. Mechanistic aspects of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* induced by cationic porphyrin derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 58, p. 332–9, 2012.

RAHIMI, R.; FAYYAZ, F.; RASSA, M. The study of cellulosic fabrics impregnated with porphyrin compounds for use as photo-bactericidal polymers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 661–668, 2016.

RAMOS, A. M. et al. Pectinolytic enzyme production by *Colletotrichum truncatum* , causal agent of soybean anthracnose. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 4, p. 186–190, 2010.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMPRAPA-CNPAF, 1994.

- REDDI, E. et al. Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, n. 5, p. 462–470, 2002.
- REZENDE, J. A. M. et al. Conceito de doença, Sintomatologia e Diagnose. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**, v 1: Princípios e Conceitos, 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2011.
- RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P. E; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1360–1362, 2014.
- SANT'ANNA, J. R.; et al. Genetic relatedness of Brazilian *Colletotrichum*. **Biological Research**, v. 43, p. 51–62, 2010.
- SARTORATO, A. Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 3, p. 211–213, 2006.
- SHIVAPRAKASH, M. R.; et al. *Colletotrichum truncatum*: An unusual pathogen causing mycotic keratitis and endophthalmitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 2894–2898, 2011.
- SIMÕES, C.; et al. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* with cationic meso-tetraarylporphyrins - The charge number and charge distribution effects. **Catalysis Today**, v. 266, p. 197–204, 2016.
- SINDIVEG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal, 2016. **Balanco 2015** – Setor de agroquímicos confirma queda de vendas. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/balanco-2015-setor-de-agroquimicos-confirma-queda-de-vendas/>>. Acesso em: 20 fev. 2017.
- SOARES, W. L. **Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura**. 163 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Saúde Pública e Meio Ambiente, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, 2010.
- SPAGNUL, C.; TURNER, L. C.; BOYLE, R. W. Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 150, p. 11–30, 2015.
- STIEF, T. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. **Medical Hypotheses**, v. 60, n. 4, p. 567-572, 2003.
- STRACHAN, T.; READ, A. **Human Molecular Genetics**. New York: Taylor & Francis Group, 2011.

- SUZAKI, K. Improved method to induce sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal fungus of grape ripe rot. **Journal of General Plant Pathology**, v. 77, n. 2, p. 81–84, 2011.
- TORRES-CALZADA, C.; et al. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. **Plant disease**, v. 99, n. 11, p. 1590–1595, 2015.
- TORTORA, G. J. .; FUNKE, B. R. .; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
- TULLU, A.; et al. Sources of resistance to anthracnose (*Colletotrichum truncatum*) in wild Lens species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, n. 1, p. 111–119, 2006.
- UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP). Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4 ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada>. Acesso em: 19 out. 2016.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA. (UFBA). **Acidentes de Trabalho devido à intoxicação por agrotóxicos entre trabalhadores da Agropecuária 2000-2011**. 4 ed., ano 2. Centro Colaborador de Vigilância em Acidentes de Trabalho: Salvador, 2012. Disponível em: <<http://www.contag.org.br/imagens/f1653boletim-agrotoxicos.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2016.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Manual de Normalização de Documentos Científicos de acordo com as normas da ABNT**. Curitiba: Editora UFPR, 2015.
- USP. UNITED STATES PHARMACOPOEIA. **Validation of Alternative Microbiological Methods**, 2006. Disponível em: <http://www.drugfuture.com/pharmacopoeia/usp32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_c1223.html>. Acesso em: 12 set. 2014.
- VANDRESEN, C. C. **Avaliação da atividade fotoinativadora de meso-tetra-arilporfirinas catiônicas em conídios do fungo *Colletotrichum graminicola***, 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, 2013.
- VANDRESEN, C. C.; et al. *In vitro* photodynamic inactivation of conidia of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum graminicola* with cationic porphyrins. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 15, n. 5, p. 673–81, 2016.

VOROBAY, A. V.; PINCHUK, S. V. Photodamage to spores of *Fusarium* fungi sensitized by protoporphyrin IX. **Biophysics**, v. 53, n. 5, p. 386–389, 2008.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 13–28, 1998.

WIJESUNDERA, R. L. C.; et al. Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 34, p. 403–413, 1989.

YAVAD, S. et al. Pectin lyase: a review. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1-10, 2009.

ZANETTE, G. F.; NÓBREGA, G. M. A.; MEIRELLES, L. D. P. Morphogenetic characterization of *Colletotrichum sublineolum* strains , causal agent of anthracnose of Sorghum. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 146–151, 2009.