



**Anastásia Naufiku  
Nogueira Ndemueda**

**Inativação fotodinâmica da bactéria fitopatogénica  
*Xanthomonas citri* subsp. *citri***

**Photodynamic inactivation of the phytopathogenic  
bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri***



## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.





**Anastásia Naufiku  
Nogueira Ndemueda**

**Inativação fotodinâmica da bactéria fitopatogénica  
*Xanthomonas citri* subsp. *citri***

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Este trabalho teve o apoio da FCT/MCT através do financiamento ao CESAM (FCT UID/AMB/50017/2019), ao QOPNA (FCT UID/QUI/00062/2019) e ao projeto PREVINE (FCT PTDC/ASP-PES/29576/2017).



Dedico este trabalho a Deus, aos meus filhos, família, amigos e ao governo do meu país pelo apoio e amor incondicional.





## **o júri**

presidente

Prof.<sup>a</sup> Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso  
Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da  
Universidade de Aveiro

vogal (arguente)

Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino  
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

vogal (orientadora)

Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha  
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro



## **Agradecimentos**

Quero expressar a minha gratidão a todos que se cruzaram na minha vida, durante esta caminhada, e que me ajudaram direta ou indiretamente a chegar até aqui,

Em Primeiro Lugar agradecer a Deus, aos meus familiares, e em especial à tia Emiliana e aos meus Filhos pelo apoio e ajuda ao longo desta caminhada,

À minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Ângela Cunha, pela orientação, ajuda, incentivo, apoio e paciência dedicados durante este trabalho,

Aos meus colegas e amigos do Mestrado e de Laboratório, em especial a Mariana e a Inês, sempre estiveram disponíveis para aconselhar e auxiliar,

Ao governo do meu país, Gratidão!



## Palavras-chave

Inativação fotodinâmica (PDI), *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, cancro cítrico, azul de toluidina O, iodeto de potássio

## Resumo

*Xanthomonas citri* subsp. *citri* é uma bactéria fitopatogénica que afeta os citrinos, causando o cancro cítrico. Esta doença tem distribuição global e representa perdas económicas significativas. Face à baixa eficácia e elevada toxicidade ambiental dos tratamentos com cobre atualmente praticados, existe a necessidade de desenvolver novas abordagens ao controle do patógeno que sejam simultaneamente eficazes, economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a aplicabilidade da inativação fotodinâmica (PDI) de *X. citri* subsp. *citri* com um fotossensibilizador comercial, como estratégia de controle da bactéria e prevenção do cancro cítrico.

Foi avaliada a PDI de *X. citri* subsp. *citri* em suspensões de células e em biofilmes construídos em suportes artificiais (ensaios *in vitro*) ou em folhas de laranja (ensaios *ex-vivo*). Foram testadas diferentes concentrações (1-100  $\mu\text{M}$ ) do fotossensibilizador azul de toluidina O (TBO) e do coadjuvante KI (1-100 mM) com irradiação durante 60 minutos com luz branca (400-700 nm, 150  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) artificial. Nos ensaios *ex-vivo*, foi também testada a irradiação com luz solar natural.

Os resultados mostraram uma redução de 5,9 log na concentração de células viáveis nas suspensões expostas 80  $\mu\text{M}$  de PS e uma redução de apenas 1,7 log na concentração de células viáveis nos biofilmes, com 100  $\mu\text{M}$  de TBO. No entanto, na presença de KI (10-100 mM), foi possível erradicar completamente os biofilmes (redução > 6 log) com 5  $\mu\text{M}$  de TBO (*in vitro*) ou 10  $\mu\text{M}$  de TBO (*ex vivo*). Com luz solar natural, conseguiu-se inativação completa de biofilmes em folhas de laranja tratadas com 50  $\mu\text{M}$  de TBO e 100 mM de KI.

Os resultados mostram que embora os biofilmes de *X. citri* subsp. *citri* sejam menos suscetíveis à PDI do que as células planctónicas, a presença de KI aumenta a eficiência de inativação sendo possível atingir inativação completa após 4 horas de irradiação das folhas com luz solar natural. A PDI apresenta assim potencial de aplicação no controle do cancro cítrico em condições de campo, embora seja necessário aprofundar os estudos que permitam demonstrar que não há riscos para a fisiologia da planta ou para a qualidade dos frutos.



## Keywords

Photodynamic inactivation (PDI), *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, citric canker, toluidine blue O, potassium iodide

## Abstract

*Xanthomonas citri* subsp. *citri* is a phytopathogenic bacterium of citrus and the causative agent of citrus canker. The disease occurs worldwide and represents important economic losses for the sector. Given the low efficacy and high environmental toxicity of current copper treatments, there is a need to develop new approaches to control the pathogen that are effective, economically viable and environmentally sustainable. The present work intended to evaluate the applicability of photodynamic inactivation (PDI) of *X. citri* subsp. *citri* with a commercial photosensitizer, as a strategy to control the bacterium and prevent citrus canker.

Assays of PDI of *X. citri* subsp. *citri* were conducted with planktonic cell suspensions and with biofilms constructed either on artificial supports (*in vitro* assays) or on the surface of orange leaves (*ex vivo* assays). Different concentrations (1-100  $\mu\text{M}$ ) of the photosensitizer toluidine blue O (TBO) and KI (1-100 mM) were tested, under irradiation conditions corresponding to 60 minutes of exposure to artificial white light (400-700 nm, 150  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). In *ex vivo* assays, irradiation with natural sunlight was also tested.

The results showed a 5.9 log reduction of viable cells in suspensions, with 80  $\mu\text{M}$  of TBO and a much smaller inactivation (1.7 log) of biofilms with 100  $\mu\text{M}$  of TBO, under similar irradiation conditions. However, in presence of KI, the biofilms were completely eradicated (> 6 log reduction) with 5  $\mu\text{M}$  TBO (*in vitro*) or 10  $\mu\text{M}$  TBO (*ex vivo*). Under natural sunlight, complete biofilm inactivation was achieved in orange tree leaves treated with 50  $\mu\text{M}$  TBO and 100 mM KI.

The results show that although the biofilms of *X. citri* subsp. *citri* are less susceptible to PDI than planktonic cells, the presence of KI increases inactivation efficiency so that complete inactivation can be achieved after 4 hours of irradiation of leaf biofilms with natural sunlight.

PDI has potential to be applied in the control of citrus canker in field conditions although further studies are needed to show that there are no risks to plant physiology or fruit quality.





## Índice Geral

<b>CAPÍTULO 1   INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> como agente de doença em citrinos .....	2
1.2. Estratégias de controle do cancro cítrico .....	5
1.3. Inativação fotodinâmica .....	7
1.3.1. Princípios do efeito fotodinâmico .....	7
1.3.2. Inativação fotodinâmica de microrganismos .....	9
1.3.3. Fotossensibilizadores, coadjuvantes e fontes de luz usados em PDI .....	12
1.3.4. Aplicações fitossanitárias da PDI .....	15
1.4. Objetivos .....	16
<b>CAPÍTULO 2   MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	17
2.1. Fotossensibilizadores e coadjuvantes .....	17
2.2. Estirpes bacterianas e condições de crescimento .....	17
2.3. Condições de irradiação .....	18
2.4. Ensaio de inativação .....	18
2.4.1 PDI de suspensões de células .....	18
2.4.2 PDI de biofilmes: ensaios <i>in vitro</i> .....	19
2.4.3 PDI de biofilmes: ensaios <i>ex vivo</i> .....	21
2.4.4 PDI de biofilmes com radiação solar natural .....	23
2.4.5 Análise estatística .....	23
<b>CAPÍTULO 3   RESULTADOS</b> .....	23
3.1. PDI de suspensões de células .....	25
3.2. PDI de biofilmes: ensaios <i>in vitro</i> .....	26
3.3. PDI de biofilmes: ensaios <i>ex-vivos</i> com luz artificial .....	28
3.4. PDI de biofilmes: ensaios <i>ex-vivos</i> com luz solar natural .....	29
<b>CAPÍTULO 4   DISCUSSÃO</b> .....	31



4.1	Perspetivas futuras.....	34
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>



## Índice de Figuras

<b>FIGURA 1.</b> Lesões do cancro cítrico na folha, no fruto e consequente queda prematura de frutos (Behlau & Belasque, 2014).....	3
<b>FIGURA 2.</b> Representação das 4 fases do ciclo epidemiológico do cancro cítrico (Adaptado de Behlau & Belasque, 2014). .....	4
<b>FIGURA 3.</b> Representação esquemática do efeito fotodinâmico subjacente aplicado à inativação de microrganismos (Wainwright et al., 2017).....	8
<b>FIGURA 4.</b> Representação esquemática da marcação de quadrados de área definida na página superior das folhas. ....	21
<b>FIGURA 5.</b> Inativação fotodinâmica <i>in vitro</i> de células planctónicas/suspensão de células de <i>X. citri subsp citri</i> . ....	25
<b>FIGURA 6.</b> Inativação fotodinâmica <i>in vitro</i> de biofilmes de <i>X. citri subsp citri</i> .....	27
<b>FIGURA 7.</b> Inativação fotodinâmica <i>ex vivo</i> de biofilmes de <i>X. citri subsp citri</i> com luz artificial... ..	28
<b>FIGURA 8.</b> Inativação fotodinâmica <i>ex vivo</i> de biofilmes de <i>X. citri subsp citri</i> com luz solar.....	29



## Índice de Tabelas

<b>TABELA 1.</b> Concentrações de TBO e KI testadas nos ensaios <i>in vitro</i> de PDI de biofilmes de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	<b>20</b>
---	-----------





## Lista de Siglas e Abreviaturas

$^1\text{O}_2$	Oxigénio Singleto
ANOVA	Análise de Variância
aPDT	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
CC	Controlo Claro
CE	Controlo Escuro
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de Hidrogénio
KI	Iodeto de Potássio
$\text{OH}\cdot$	Radicais de hidroxilo
PDI	Inativação Fotodinâmica
PDT	Terapia Fotodinâmica
PS	Fotosensibilizador
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
TBO	Azul de Toluidina O
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
<i>X. citri</i>	<i>Xanthomonas citri</i>



## Capítulo 1 | Introdução

Os citrinos representam uma das mais importantes culturas frutícolas. De acordo com os dados do *Food and Agriculture Organization of The United Nations* (FAO), a produção mundial de citrinos, em 2016, era de aproximadamente 124 mil milhões de toneladas, sendo 79% da produção obtida no hemisfério Norte. A laranjas representam a maior fração da produção total (50%), seguindo-se as tangerinas (29%), os limões e limas (14%), e as toranjas (7%) (FAO, 2017).

Em Portugal continental os citrinos representavam, em 2007, 31% da produção total de frutos frescos, sendo as laranjas a principal cultura (24% da produção de fruta) com especial importância no Algarve (MADRP-GPP, 2007). De acordo com os dados do Instituto Nacional de Estatística, a produção da laranja tem vindo a aumentar quer em termos de produção quer em termos de superfície plantada (INE, 2018). Entre 2016 e 2017 registou-se um aumento de 6,7% na produção (320 mil toneladas) e de 133 ha na área de laranjal (INE, 2018).

Os citrinos apresentam elevados riscos de contrair doenças de origem infecciosa (vírus, bactérias fungos) ou não infecciosa. O cancro cítrico é uma doença infecciosa de ocorrência global que constitui uma das maiores ameaças à cultura de citrinos. O agente etiológico do cancro cítrico é a bactéria fitopatogénica de Gram-negativo *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, com os sinónimos *Xanthomonas campestris* pv. *citri* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Behlau & Belasque, 2014). Embora não exista um consenso mundial quanto à taxonomia da bactéria causadora do cancro cítrico, a classificação corrente tem considerado três “tipos” ou patovares diferentes de cancro (Amaral, 2003; Moreira et al., 2010): O *Tipo A*, é causado por *X. axonopodis* pv. *citri*, com origem na Ásia, provavelmente no sul da China, Indonésia ou Índia, é o tipo mais difundido e causa o maior prejuízo económico a nível mundial; o *Tipo B* ou “falso cancro”, com origem na América do Sul, está presente apenas na Argentina, Paraguai e Uruguai; o *Tipo C* tem ocorrência restrita ao estado de São Paulo no Brasil. O cancro cítrico dos tipos B e C é causado por *X. axonopodis* pv. *aurantifoli*.

A doença provoca danos e perdas económicas relevantes e por isso, o seu controle mobiliza consideráveis recursos humanos e financeiros. As principais consequências do cancro cítrico em áreas onde a doença é endémica são a desfolha de plantas e queda prematura de frutos. A perda de folhas compromete a área fotossintética da planta resultando em menor produtividade não só na colheita imediata como também em colheitas futuras. No entanto, as maiores perdas económicas estão relacionadas com a queda de frutos antes da colheita, que pode chegar até 80%, e o aparecimento de lesões nos frutos (Behlau & Belasque, 2014). Os frutos com lesões de cancro cítrico não podem ser comercializados, nem no mercado interno em áreas livres de doença, nem no mercado internacional (Moreira et al., 2010).

### **1.1. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* como agente de doença em citrinos**

*Xanthomonas citri* é uma Proteobateria pertencente à família *Xanthomonadaceae*. A patogenicidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* deve-se principalmente à sua capacidade de colonização do hospedeiro e subsequente produção e secreção de enzimas e proteínas que degradam constituintes da parede celular para penetrar nas células, causando danos nos tecidos da planta (Kazemi-Pour et al., 2004).

O género *Xanthomonas* inclui 27 espécies consideradas como fitopatogénicas que no seu conjunto, estão associadas a doenças de uma grande diversidade de plantas, algumas delas de elevado valor económico, como o arroz, pimento, tomate, destacando-se os citrinos (Ryan et al., 2011). Uma vez que dentro de cada espécie do género *Xanthomonas* há alguma especificidade relativamente às plantas hospedeiras, são ainda definidos patotipos ou *patovars*. Contudo, esta classificação apresenta ainda problemas práticos: (i) na maioria dos casos, o leque de hospedeiros de cada *patovar* não está totalmente identificado; (ii) existe uma heterogeneidade genotípica significativa dentro de cada *patovar* (iii) as bactérias não patogénicas não podem ser associadas a *patovars* (Vauterin et al., 2000).

Os sintomas do cancro cítrico são relativamente evidentes permitindo uma identificação fácil e precoce. O primeiro sintoma corresponde ao aparecimento de pequenos pontos escuros nas folhas ou frutos, frequentemente rodeados de um halo amarelado, resultantes da multiplicação da bactérias e invasão dos tecidos da planta. Estes pontos transformam-se em pústulas salientes de coloração castanho-clara e podem atingir mais de um centímetro de diâmetro (Figura 1A e 1B). Em árvores seriamente infetadas ocorre desfoliação e queda prematura dos frutos (Figura 1C) (Gottwald et al., 2002).



Figura 1. Lesões do cancro cítrico na folha (A), no fruto (B) e consequente queda prematura de frutos (C) (Behlau & Belasque, 2014).

No ciclo epidemiológico do cancro cítrico (Figura 2) podem distinguir-se 4 fases. A fase de **disseminação** envolve a transferência de células da por ação de agentes naturais como chuvas ou vento, ou ainda por intervenção humana através do contacto com enxertos, máquinas, equipamentos, utensílios de colheita e de poda e vestuário infetado. A fase de **infeção** inicia-se com a penetração da bactéria na planta, através de aberturas naturais, como os estomas, ou de lesões de origem mecânica ou provocados por insetos. As condições ambientais favoráveis à proliferação da bactéria dentro dos tecidos da planta correspondem a temperaturas de 20-35 °C (Pruvost et al., 2002; Behlau & Belasque, 2014). Durante a fase de **colonização**, a bactéria multiplica-se no espaço intercelular dos tecidos do hospedeiro, libertando enzimas que degradam os constituintes celulares para obtenção de nutrientes. É nesta fase que se desenvolvem os sintomas característicos. A fase de **sobrevivência** corresponde à persistência de um ano para o outro de células viáveis em lesões remanescentes em frutos, e ramos da planta. Na

presença de água, estas lesões tornam-se mais permeáveis e permitem a libertação de células bacterianas que ao serem disseminadas, reiniciam o ciclo da doença.

Quando as bactérias aderem a uma superfície inicia-se o desenvolvimento de um biofilme (Li & Wang, 2011; An et al., 2019). A capacidade de formar biofilmes na superfície dos órgãos da planta é um dos principais determinantes da virulência de *X. citri* subsp *citri*. Os biofilmes são comunidades bacterianas nas quais as células estão incorporadas numa matriz extracelular de substância polimérica composta por exopolissacarídeos (EPS), DNA extracelular (eDNA), proteínas e lípidos (Limoli et al., 2015). O desenvolvimento de biofilmes bacterianos envolve diferentes etapas que se caracterizam pela ligação reversível das células a uma superfície sólida, perda de mobilidade, síntese de matriz e ligação irreversível, divisão celular e organização em microcolónias, maturação das microcolónias, senescência e libertação de células na forma planctónica (Li & Wang, 2011).

O fenótipo biofilme fornece proteção acrescida contra o stress abiótico na filosfera, facilita a comunicação célula a célula por processos de *quorum sensing* e gera uma variabilidade genética por transferência horizontal de genes, o que permite que a comunidade bacteriana se adapte melhor a mudanças ambientais (An et al., 2019; Rigano, 2007).

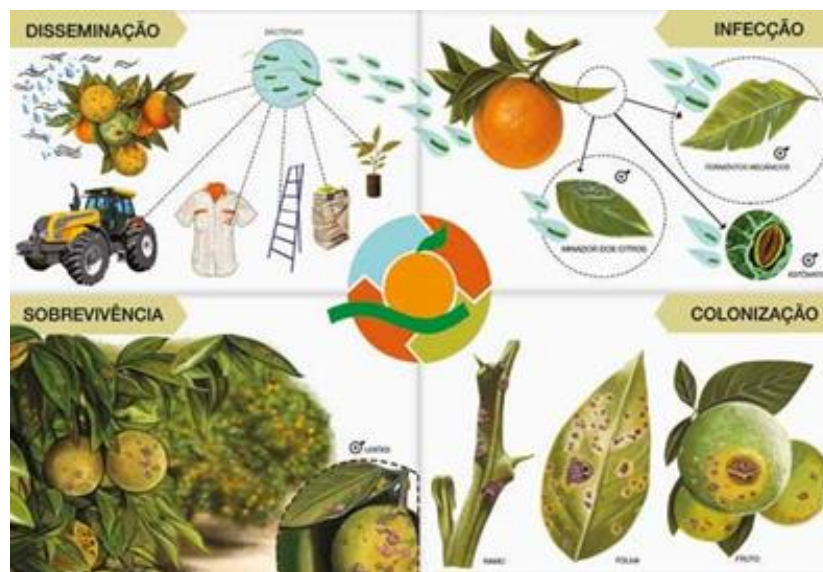


Figura 2. Representação das 4 fases do ciclo epidemiológico do cancro Cítrico. (Adaptado de Behlau & Belasque, 2014).

## 1.2. Estratégias de controle do cancro cítrico

As medidas de controlo do cancro cítrico variam entre regiões em que a doença é ou não endémica. Quando se detetam infeções pontuais e geograficamente restritas em regiões em que a doença não é endémica, o método aplicado para controlar o alastramento é a erradicação de plantas infetadas (Moreira et al., 2010). Neste caso, os focos tendem a ser formados por poucas plantas e o impacto direto nos custos de produção é menor. Porém, se as medidas de inspeção e eliminação de focos não são devidamente executadas, há maior probabilidade de ocorrência da doença, da formação de focos com elevado número de árvores afetada e de maiores perdas económicas. Neste caso, as inspeções têm de ser mais frequentes o que agrava os custos de produção (Behlau & Belasque, 2014).

Quando a doença é endémica, o controle envolve o controle rigoroso da qualidade fitossanitária das árvores e enxertos (Moreira et al., 2010) bem como a seleção de variedades naturalmente menos suscetíveis ou geneticamente modificadas (Mendes et al. 2010; Jia et al., 2017; Kobayashi et al., 2017). No entanto, estas estratégias levantam questões de produtividade, adaptabilidade às condições ambientais locais e aceitação por parte do consumidor de alimentos geneticamente modificados. Além disso, estes métodos não permitem evitar totalmente a infeção nem erradicar completamente esta doença. Assim, são também aplicados métodos químicos ou biológicos que matem a bactéria ou diminuam a sua viabilidade e capacidade para formar biofilmes (Lin et al., 2004; Li & Wang, 2011).

Os bactericidas cúpricos representam ainda a abordagem química mais popular. No entanto, têm um carácter estritamente preventivo não apresentando eficácia curativa nem atividade sistémica na planta (Lamichhane et al., 2018). O cobre presente na grande maioria das formulações cúpricas adere à superfície das folhas, ramos e frutos e forma uma barreira protetora. Essas aplicações resultam em maiores custos de produção (e.g. recursos humanos e consumíveis) e não têm eficácia absoluta uma vez que a queda de frutos pode representar 20% da produção inicial (Behlau & Belasque, 2014). Por outro lado, a aplicação de biocidas à base de cobre representa riscos para o ambiente e para os operadores, obriga a procedimentos rigorosos de descontaminação de utensílios e de

eliminação de resíduos, colocam riscos de contaminação de águas subterrâneas e podem induzir a resistência bacteriana a biocidas (Amaral, 2003; Behlau & Belasque, 2014; Moreira et al., 2010; Young et al., 2018). O uso prolongado destes bactericidas pode induzir o desenvolvimento de linhagens bacterianas de *X. citri* resistentes a este metal (Behlau et al., 2013; Richard et al., 2017) e comprometer a eficácia do controle químico. O cobre é um dos elementos essenciais ao metabolismo celular em organismos procariontes e eucariotas, agindo como cofator de metaloproteínas e enzimas envolvidas na respiração, como oxigenases e de proteínas de transporte de elétrons (Dupont et al., 2011). Em altas concentrações o cobre torna-se citotóxico por induzir a produção de radicais livres e conseqüentemente, danificar membranas lipídicas e DNA (Chillappagari et al., 2010). Na década de 90 do séc. XX foi reportada pela primeira vez, na Argentina, uma linhagem de *X. citri* resistente ao cobre (*X. citri* CuR) em viveiros que receberam aplicações regulares de bactericidas à base de cobre (Canteros et al., 2008). Mais recentemente, isolados *X. citri* CuR também foram detetados nos territórios franceses de Ilha Reunião e Martinica (Richard et al., 2017). Assim, em alternativa às tradicionais pulverizações com sulfato de cobre foram propostas outras estratégias de controle: i) compostos com baixa concentração de cobre, como o sulfato de cobre penta-hidratado, aplicados no solo e em *sprays* podem ser eficazes em determinados estados fenológicos da planta (Favaro et al., 2017); ii) pulverização com outros compostos químicos, como ésteres de ácido gálico, que evidenciam forte efeito sobre *X. citri* (Saveitto et al., 2018); iii) utilização de nanopartículas de óxido de zinco (Graham, et al. 2016); iv) aplicação do solo de inseticidas neonicotinóides sistêmicos e o indutor de resistência adquirida sistêmica comercial (SAR), acibenzolar-S-methyl (ASM) (Graham & Myers, 2016); v) controle biológico com bactérias endofíticas, como *Bacillus amyloliquefaciens* LE109 ou *B. subtilis* LE24 (Daunfu et al., 2019); vi) controle biológico com bactérias produtoras de inibidores de *quorum sensing* ou metabolitos secundários tóxicos (Villamizar & Caicedo, 2019); vii) a aplicação de bacteriófagos (Ibrahim et al. 2017).

A capacidade de *X. citri* subsp *citri* para formar biofilmes é um fator que agrava a sua virulência e resistência a tratamentos antibacterianos, uma vez que o fenótipo biofilme é reconhecidamente mais resistente a stresse químico do que a forma



planctónica (Singh et al., 2017). As estratégias existentes para o controlo de biofilmes implicam tratamentos físicos, químicos ou biológicos, embora as abordagens químicas sejam as mais comuns e economicamente mais viáveis (Lin et al., 2004). Estudos comprovam que inibidores de biofilmes são uma estratégia de prevenção que pode ser eficaz no combate ao cancro cítrico. Moléculas como D-leucina e 3-indolilacetoneitrilo (IAN) diminuem a resistência de *X. citri subsp. citri* ao cobre e a outros agentes antibacterianos (Li & Wang 2014).

A necessidade de encontrar estratégias que sejam operacionalmente viáveis, assegurando elevada eficiência, baixa toxicidade ambiental e boa sustentabilidade económica justifica que continue a investigar sobre alternativas inovadoras para o controle de infeções de *Xanthomonas citri subsp. citri* em plantas cultivadas.

### **1.3. Inativação fotodinâmica**

#### **1.3.1. Princípios do efeito fotodinâmico**

A base da PDI é a interação entre um composto não-tóxico, luz e oxigénio (Figura 3). O composto (fotossensibilizador, PS), uma vez ativado pela luz, catalisa a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) que vão induzir danos oxidativos nas estruturas que constituem os microrganismos, particularmente lípidos, proteínas, incluindo enzimas, e ácidos nucleicos, levando à sua inativação (Hamblin & Hansan, 2004; Almeida et al., 2015).

Ao ser irradiado com luz de comprimento de onda adequado, o PS absorve energia e transita para um estado excitado. Devido à instabilidade deste estado, o PS pode regressar ao estado fundamental emitindo luz (fluorescência) ou transitar para uma forma intermédia mais estável (estado tripleto). O PS no estado tripleto pode regressar ao estado fundamental por fosforescência (emissão de luz) ou interagir com o meio por dois mecanismos distintos, mecanismos de tipo I ou tipo II (Huang et al. 2012). No

mecanismo tipo I, ocorre a transferência de elétrons entre o PS e um substrato, e consequentemente são produzidas espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como radicais hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), anião superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). No mecanismo tipo II, o PS reage com o oxigênio molecular levando à formação de oxigênio singleto,  $^1\text{O}_2$ . O oxigênio singleto possui uma elevada reatividade, apresenta um curto tempo de vida (menos de 40 nano segundos) e um raio de ação de aproximadamente 20 nm, pelo que a inativação microbiana é eficaz quando a sua produção ocorre próximo dos alvos biológicos (Bonnett, 2000; Wainwright, 1998; Wainwright et al., 2017).

Geralmente, um destes mecanismos é favorecido relativamente ao outro, dependendo sobretudo dos substratos e das características do PS (Huang et al. 2012). Uma vez que a formação de ROS e os danos causados em biomoléculas estão dependentes da irradiação, não ocorrem danos citotóxicos no escuro (Alves et al., 2014; Almeida et al, 2015; Wainwright et al., 2017).

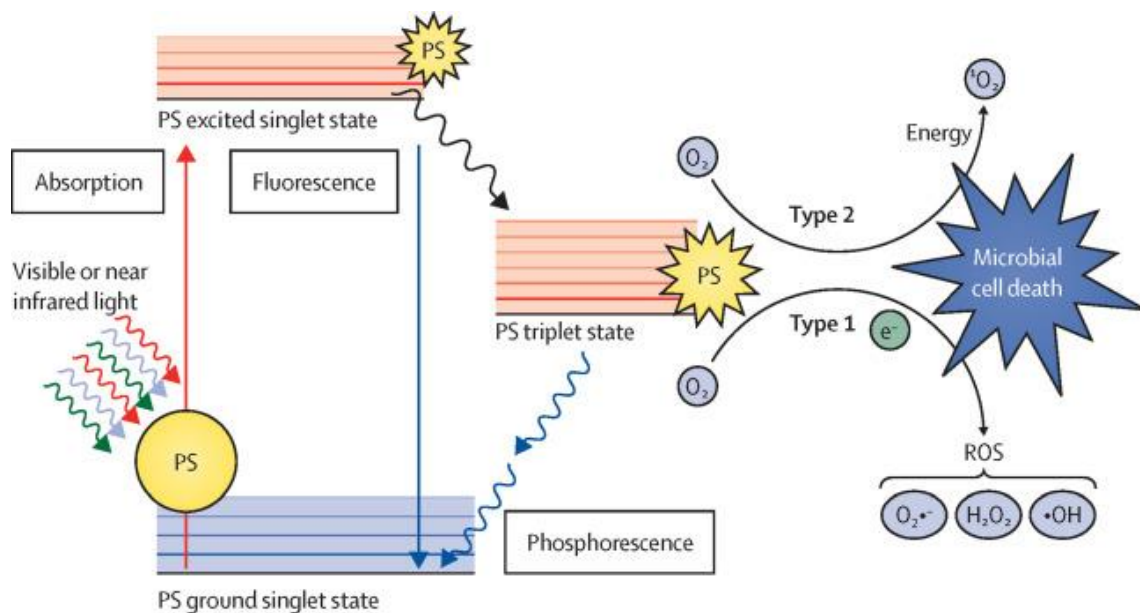


Figura 3. Representação esquemática do efeito fotodinâmico subjacente aplicado à inativação de microrganismos (Wainwright et al., 2017).

### 1.3.2. Inativação fotodinâmica de microrganismos

Embora a terapia fotodinâmica anti-tumoral (*photodynamic therapy*, PDT) represente historicamente e ainda no presente, a mais proeminente aplicação biológica do efeito fotodinâmico (Abrahamse & Hamblin 2016), este tem vindo progressivamente a ser alargado ao tratamento de doenças de natureza infecciosa, sob a designação de terapia fotodinâmica antimicrobiana (*antimicrobial photodynamic therapy*, aPDT) ou quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (*photodynamic antimicrobial chemotherapy*, PACT) (Wainwright 2019). Mais recentemente, a inativação fotodinâmica de microrganismos (*photodynamic inactivation*, PDI) tem sido transposta para aplicações não diretamente relacionadas com a saúde humana (Alves et al. 2015), como a desinfecção de águas (Almeida et al., 2009; Fernández et al., 2016; Bartolomeu et al., 2017; Lesar et al., 2019), na promoção da segurança alimentar (Ghate et al., 2019) e no controle de microrganismos fitopatogénicos (Gomes et al., 2011, Jesus et al., 2018; Glueck et al. 2019).

Em relação ao uso de compostos antimicrobianos convencionais, a PDI apresenta diversas vantagens: (a) é uma abordagem segura e capaz de inativar diferentes tipos de microrganismos independentemente do seu perfil de resistência a antibióticos ou antifúngicos (Almeida et al., 2014; Alves et al., 2018); (b) atinge diferentes alvos moleculares/celulares particularmente na estrutura externa, pelo que é eficaz num largo espectro de microrganismos incluindo vírus, procariotas e eucariotas e não depende da translocação e acumulação do PS no compartimento intracelular (Preuss et al., 2013; Pereira et al., 2014); (c) envolve agentes citotóxicos, particularmente o oxigénio singlete, para os quais as células não possuem mecanismos eficientes de defesa ou detoxificação (Maisch, 2015); (d) não está até ao momento demonstrado o desenvolvimento de resistência específica ao stresse oxidativo e apenas alguns corantes (fenotiazinas) são considerados como substratos potenciais das bombas de efluxo (Cieplik et al. 2018). Assim, a PDI representa uma alternativa promissora para o controle de microrganismos em diferentes contextos, sendo o tipo de microrganismo, o tipo de PS e os parâmetros operacionais da irradiação os principais determinantes da eficiência do processo.

Embora a eficácia da PDI tenha sido demonstrada em todos os grupos de microrganismos, as características estruturais particulares de cada grupo influenciam significativamente a sua suscetibilidade à PDI (Hamblin & Hasan 2004). O sucesso da fotossensibilização depende da ligação inicial do PS às estruturas externas, como a membrana celular e a parede de bactérias e de fungos, e a cápside proteica e invólucro lipídico dos vírus (Demidova & Hamblin 2005, Hotze et al. 2009) e assim, a composição destas é um dos principais determinantes das diferentes suscetibilidades dos microrganismos à PDI (Pereira et al. 2014).

De uma forma geral, observa-se que os vírus são mais facilmente inativados do que as bactérias, requerendo concentrações de PS mais baixas e menores doses de luz (Ke et al. 2014). Os vírus com invólucro são mais sensíveis do que os vírus que não apresentam esta estrutura (Wainwright 2004, Costa et al. 2012) sendo as glicoproteínas do invólucro ou as proteínas da cápside são os alvos primários da fotossensibilização em vírus com ou sem invólucro, respetivamente (Wainwright 1998, Majiya et al. 2018).

As bactérias de gram-positivo são mais suscetíveis à PDI do que as bactérias de gram-negativo em virtude das diferenças na estrutura e composição da parede celular (Almeida et al., 2015). A presença de uma membrana externa nas bactérias de gram-negativo, aumenta a complexidade estrutural e a sua carga negativa diminui a interação com PSs aniónicos ou neutros, funcionando como uma barreira física e funcional. A inativação de bactérias de gram-positivo ocorre mais facilmente uma vez que a camada de peptidoglicano é mais porosa e permeável relativamente às bactérias de gram-negativo (Alves et al. 2009). De uma forma geral, a PDI de bactérias é feita com PSs catiónicos embora PSs aniónicos ou neutros possam ser eficazes em bactérias de gram-negativo desde que combinados com agentes, normalmente catiónicos, que causem destabilização da parede (Polo et al. 2000).

Os endósporos bacterianos possuem um revestimento mais complexo e resistente do que as células vegetativas e representam por isso, um desafio particular em termos de inativação fotodinâmica. Assim, a PDI de endósporos requer concentrações de PS e doses de energia consideravelmente mais elevadas do que as necessárias para a inativação completa das células vegetativas correspondentes (Oliveira et al. 2009).

A inativação de fungos requer em geral concentrações mais elevadas de PSs do que as necessárias para a inativação de bactérias (Demidova & Hamblin 2005). A parede fúngica apresenta uma mistura de glucanas, mananas, glicoproteínas e quitina que a tornam ainda menos permeável aos PSs do que a parede das bactérias de gram-negativo (Tegos et al. 2012). O mecanismo de fotossensibilização de fungos envolve a permeabilização da parede e da membrana celular, e a ocorrência de danos em organelos como os lisossomas, mitocôndrias e núcleo. Deste modo, a PDI de fungos envolve uma maior diversidade de alvos celulares (Calzavara-Pinton et al. 2012). Os esporos fúngicos são também suscetíveis à PDI (Gomes et al. 2011) mas ao contrário do que acontece com os endósporos bacterianos, podem ser mais suscetíveis do que as hifas ou células vegetativas. Embora a composição da parede dos esporos fúngicos seja bastante variável, o que pode afetar a ligação do PS, experiências com dermatófitos têm demonstrado que os microconídios são completamente inativados com concentrações de PS significativamente mais baixas do que as necessárias para a inativação de suspensões de hifas (Smijts & Pavel 2011).

Nos biofilmes microbianos, a matriz polimérica que constitui 90% da massa total (Pamp et al. 2007), comporta-se como uma barreira física e química que torna estas comunidades (fenótipo biofilme) mais resistentes a stresse ambiental, carência de nutrientes e agentes antimicrobianos do que as células livres (fenótipo plantônico) (Oliveira et al. 2015, Gambino & Cappitelli 2016, Singh et al. 2017). A PDI tem sido aplicada com sucesso na inativação de biofilmes, não exclusivamente na área da saúde. Experiências com porfirinas catiónicas, ftalocianinas, clorinas ou corantes demonstraram um efeito significativo sobre biofilmes bacterianos, fúngicos ou mistos (Pereira et al. 2011, Vilela et al. 2012, Dovigo et al. 2013, Beirão et al. 2014, Lourenço et al. 2015). Tendo em perspectiva aplicações relacionadas com segurança alimentar, têm sido testados PS naturais, como curcumina (Andrade et al. 2013) e clorofila (Astuti et al. 2016). A eficiência de PDI das células agregadas em biofilmes é normalmente menor do que a que se obtêm com suspensões de células mas a aplicação de agentes desestabilizadores da matriz extracelular, como a acetilcisteína (Kashef et al. 2015), ou inibidores de *quorum sensing*, como a luteolina (Sun et al. 2019) aumenta a suscetibilidade dos biofilmes à

fotossensibilização. Fotossensibilizadores imobilizados em quitosano revelaram inibição do desenvolvimento de biofilmes de *Listeria* (Castro et al. 2017), o que abre perspectivas para o desenvolvimento materiais de embalagem anti-biofilme.

### **1.3.3. Fotossensibilizadores, coadjuvantes e fontes de luz usados em PDI**

A estrutura dos PSs condiciona fortemente as suas características e o seu desempenho (Abrahamse & Hamblin 2016). As propriedades foto-químicas e foto-físicas e a afinidade para os alvos celulares e moleculares determinam a intensidade dos efeitos biológicos e conseqüentemente, a eficiência de inativação. Um bom PS deve produzir oxigênio singleto ou outros ROS, deve ser foto-estável durante o período de irradiação, e não deve ser mutagénico (Martinez et al., 2017). Deve ainda ser solúvel em água, ter algum grau de seletividade de modo a não causar danos em células ou tecidos não-alvo e não apresentar toxicidade no escuro (Maisch, 2015).

A escolha do PS depende, desde logo, do tipo de aplicação (e.g. clínica, ambiental), do tipo de alvo biológico (e.g. células tumorais, vírus, bactérias, fungos, esporos) e do tipo de luz que se pretende usar microrganismo (Almeida et al., 2011; Yano et al., 2011).

Os primeiros PSs usados em PDT foram derivados de compostos naturais, como o derivado da hematoporfirina, o HpD, e uma forma purificada de hematoporfirina, o Photofrin II (Kou et al., 2017). Estes PSs de primeira geração revelaram no entanto, problemas de toxicidade no escuro, fotossensibilidade cutânea prolongada e propriedades foto-físicas não ideais, uma vez que possuíam baixa absorção de luz na zona do vermelho, sendo esta característica importante para a penetração da luz nos tecidos (de Freitas & Hamblin 2016). Na tentativa de ultrapassar algumas destas desvantagens, surgiu uma segunda geração de PSs (e.g. ácido aminolevulínico, N-aspartil clorinas) essencialmente constituída por macrociclos tetrapirrólicos com estruturas bem definidas e com propriedades melhoradas em termos de espectro de absorção e seletividade para os alvos biológicos (Kou et al., 2017). Os PSs de terceira geração foram desenvolvidos para melhorar a afinidade e seletividade para os alvos biológicos através, nomeadamente,

através da conjugação com açúcares ou anticorpos e do encapsulamento (Kataoka et al., 2017).

PSs catiónicos e com caráter anfifílico como porfirinas, ftalocianinas e clorinas são os mais usados em PDI de microrganismos (Cieplik et al., 2018). Apesar do desenvolvimento de PSs não-porfirínicos ser atualmente uma linha de investigação consideravelmente menos explorada, alguns compostos naturais (e.g. curcumina, clorofilina e riboflavina) têm sido testados para aplicações em alimentos (Luksiene & Brovko 2013, Bonifácio et al. 2018). Os corantes fenotiazínicos tais como o azul-de-metileno (MB) e o azul de toluidina O (TBO), estão aprovados para uso clínico e são bastante aplicados em medicina dentária (Carrera et al., 2016). Estes últimos, são solúveis em água, possuem carga positiva e tal como acontece com os macrociclos tetrapirrólicos, podem conseguir-se melhorias no seu desempenho como PSs por modificações estruturais adequadas (O'Connor et al. 2009; Bacellar et al. 2014).

Os coadjuvantes usados em PDI têm como objetivo aumentar a eficiência de inativação. Para além de alguns compostos que interferem diretamente em constituintes da matriz extracelular ou em processos de comunicação celular (*quorum sensing*) característicos de biofilmes, surfactantes, como o SDS, quelantes, como o EDTA, e alguns sais não tóxicos, como o iodeto de potássio (KI) permitem intensificar o efeito fotodinâmico e em alguns casos, reduzir o tempo de irradiação e a concentração de PS (Das Ghatak et al., 2018 ; Vieira et al., 2018).

O KI é um sal com efeito antifúngico que exhibe também um efeito potenciador de fármacos antifúngicos (Reis et al. 2016). Tem sido alvo de vários estudos que demonstram a sua eficácia como coadjuvante do efeito fotodinâmico do dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), fulerenos, porfirinas e corantes, sobre suspensões de bactérias de gram-negativo, gram-positivo e fungos, bem como em biofilmes de *Candida albicans* (Freire et al., 2016; Huang et al., 2018). O Photofrin, que causa efeito reduzido em bactérias de gram-negativo, inativa eficazmente *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Acinetobacter baumannii* quando combinado com o KI (Huang et al., 2017). O mesmo se verifica com rosa de bengala, que quando usado em combinação com

KI em modelos murinos, demonstrou eficácia contra *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (Wen et al., 2017).

O efeito potenciador é exercido sobretudo através do mecanismo tipo I. O KI reage com o oxigénio singlete (produzido pelo PS sob ação da luz) formando peroxideto ( $\text{HOOI}_2^-$ ). Dependendo do grau de ligação do PS às células microbianas, o  $\text{HOOI}_2^-$  pode ser decomposto segundo duas reações distintas: o peroxideto decompõe-se em iodo livre ( $\text{I}_2/\text{I}_3^-$ ) e formando-se peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou o peroxideto sofre uma clivagem homolítica que produz radicais reativos de iodo ( $\text{I}_2\bullet^-$ ) (Zhang et al., 2015 ; Freire et al., 2017; Hamblin, 2017).

A luz é um requisito essencial do efeito fotodinâmico e a escolha da fonte de luz deve obrigatoriamente ter em conta do espectro de absorção do PS e o tipo de matriz em que a luz será aplicada (tecidos vivos, matrizes inertes, alimentos). As fontes de luz mais usadas são as lâmpadas, lasers, *light-emmiting diodes* (LEDs) e a radiação solar (Wainwright, 1998; Calin & Parasca, 2009). Os LEDs são fontes de luz económicas, embora de relativamente baixa potência, sendo bastante aplicados em medicina dentária e dermatologia (Hempstead et al. 2015, Paschoal et al. 2015). Pelo contrário, os lasers são fontes de luz de elevada potência, que podem emitir um comprimento de onda específico para um fotosensibilizador sendo usadas em aplicações clínicas dermatológicas e anti-tumorais (Kessels et al., 2016, Shafirstein et al., 2017). A luz solar é uma fonte de baixo custo, com um largo espectro de comprimentos de onda, mas cuja potência não é estável (varia consoantes os dias e o clima). No entanto, sendo amplamente acessível, tem sido aplicada com sucesso em algumas situações clínicas (Morton & Braathen 2018) mas sobretudo na desinfeção de água para consumo humano (Ryberg et al., 2018), e outras aplicações não clínicas (Bartolomeu et al., 2017; Gonzales et al., 2017; Roeder et al., 2018).

Para além da fonte e do espectro da luz, a fluência, o tempo e o regime de aplicação são também fatores que influenciam a eficiência do processo. Embora assente numa relação direta entre dose de luz e efeitos causados, a eficiência da PDI é também dependente da taxa com que a energia é aplicada ao longo do tempo (Túner & Hode, 1998; Costa et al., 2010).



#### 1.3.4. Aplicações fitossanitárias da PDI

A prática da livre circulação de material vegetal, decorrente da criação do mercado único em 1993, impôs, a todos os países da União Europeia (UE), a adoção de regras fitossanitárias precisas por forma a defender os ecossistemas agrários dos riscos de introdução e dispersão de certos organismos prejudiciais. Decreto-Lei n.º 154/2005<sup>1</sup>, define as medidas de proteção fitossanitária com objetivo de controlar doenças causadas por bactérias, fungos, vírus e insetos. Algumas das infeções mais relevantes em citrinos são o cancro cítrico e a clorose variegada, causadas respetivamente por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xilella fastidiosa*. De entre as infeções fúngicas dos citrinos, a gomose causada por *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora*, a rubelose, causada por *Corticium salmonicolor*, a verrugose causada por *Elsinoe fawcetti*, a melanose causada por *Phomopsis citri*, a pinta-preta causada por *Guignardia citricarpa* e a estrelinha causada por *Colletotrichum acutatum*. As viroses (leprose, tristeza, exocorte) são normalmente veiculadas por insetos portadores (Azevedo, 2003).

Os métodos de controlo envolvem sobretudo tratamentos químicos que têm efeitos nocivos sobre o ambiente e representam potenciais riscos para a saúde humana, para além de potenciarem o desenvolvimento de estirpes resistentes (Marques et al., 2016). Como alternativa, existem já métodos de controle biológico, como a introdução de insetos predadores e ou microrganismos produtores de compostos com efeito antifúngico ou anti-parasitário (Patt et al., 2015; Santos et al., 2016).

Nas últimas décadas, vários estudos têm demonstrado a eficácia de outras formas de controle de bactérias e fungos fitopatogénicos. O tratamento fotodinâmico antimicrobiano é uma abordagem promissora baseada na luz para controlar doenças causadas por fungos patogénicos.

O antifúngico harmol, quando excitado com luz UVA, apresenta maior eficiência da inativação de conídios de fungos fitopatogénicos (Olmedo et al., 2017). O tratamento azul de metileno (methylene blue, MB) conseguiu reduzir a germinação e viabilidade de

---

<sup>1</sup> Diário da República n.º 171/2005, Série I-A de 2005-09-06.

conídios do fungo *Colletotricum abscissum* em folhas de citrinos expostas à radiação solar (Gonzalez et al., 2017).

Um estudo focado no cancro do Kiwi demonstrou que a PDI é eficaz em inativar a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* em folhas de kiwis, sob irradiação solar, sem danificar a planta (Martins et al., 2018). No entanto, são ainda relativamente escassos os estudos de PDI aplicados ao controle de bactérias patogénicas de plantas.

#### **1.4. Objetivos**

Este trabalho teve como objetivo geral contribuir para o desenvolvimento de um protocolo de controle fotodinâmico do cancro cítrico. Para tal foram definidos os seguintes objetivos específicos relativamente à PDI do agente causal da doença, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*:

- (a) Avaliar a suscetibilidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* à fotossensibilização com o corante azul de toluidina;
- (b) Comparar a suscetibilidade à PDI *in vitro* de biofilmes e da forma planctónica;
- (c) Avaliar o efeito coadjuvante KI na eficiência de PDI de biofilmes;
- (d) Avaliar a representatividade dos ensaios de inativação de biofilmes *in vitro* por comparação com os efeitos obtidos *ex vivo*;
- (e) Comparar a eficiência de PDI com luz artificial e luz solar natural.

## Capítulo 2 | Materiais e Métodos

### 2.1. Fotosensibilizadores e coadjuvantes

O fotossensibilizador (PS) usado nos ensaios de PDI foi o corante azul de toluidina O (TBO, Sigma-Aldrich). A solução de trabalho a 500  $\mu$ M foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). A solução de PS foi armazenada a 4 °C, num frasco de vidro envolvido em folha de alumínio para prevenir a exposição à luz e consequente fotodegradação. Como coadjuvante foi usado iodeto de potássio (KI, Atom Scientific). Em cada ensaio, preparou-se uma solução aquosa a 5 M.

Antes de cada ensaio, as soluções de TBO e de KI foram sonicadas durante 30 min para assegurar a sua completa homogeneidade.

### 2.2. Estirpes bacterianas e condições de crescimento

A estirpe de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Xcc 306 (Gonçalves et al., 2015) foi cedida pelo Prof. William Nunes, da Universidade Estadual de Maringá (Brasil). Uma cultura densa em meio Tryptic Soy Broth (TSB, Liofilchem) foi conservada a 80 °C com 20% de glicerol como crioprotetor. A estirpe bacteriana foi revivificada por cultivo em TSB, a 37 °C, com agitação (180 rpm) durante cerca de 24 h. A cultura em fase exponencial, foi semeada à superfície em placas de Tryptic Soy Agar (TSA, Liofilchem) para a obtenção de colónias isoladas e confirmação da pureza. As placas contendo colónias isoladas foram renovadas semanalmente, incubadas a 37 °C durante 24 h e conservadas no frigorífico.

Antes de cada ensaio, preparou-se uma cultura em meio líquido transferindo 1 colónia isolada para um frasco contendo cerca de 30 mL de meio TSB e incubado a 37 °C com agitação (180 rpm) durante cerca 24 horas. As culturas de trabalho foram obtidas repicando novamente a cultura líquida e incubado nas mesmas condições. A cultura de

trabalho foi usada para a preparação dos biofilmes e suspensões de células usados nos ensaios de PDI.

### **2.3. Condições de irradiação**

Para os ensaios de PDI com luz artificial utilizou-se uma fonte de luz branca (400–800 nm) constituída por uma lâmpada de quartzo/halogénio (LUMACARE modelo 122, EUA) de 250 W e por uma sonda de fibra ótica. Os ensaios foram realizados com uma irradiação de 150 mW.cm<sup>-2</sup>. Os ensaios de PDI com luz natural foram realizados expondo as amostras a luz solar indireta junto a uma janela, durante o verão, com uma irradiância máxima correspondente a ~60 mW.cm<sup>-2</sup> (Clim@UA).

### **2.4. Ensaio de inativação**

Os ensaios de inativação envolveram suspensões de células e biofilmes construídos sobre um suporte artificial (*in vitro*) ou sobre folhas de laranjeira (*ex vivo*). Os ensaios ex-vivos foram realizados numa primeira fase com luz artificial e mais tarde, com luz solar natural. Em cada tipo de ensaios, foram testadas várias combinações de concentração de TBO e KI. Foram incluídos controlos em todos os ensaios. O controlo claro (CC) corresponde apenas ao material biológico (suspensão de células ou biofilme) exposto à luz em condições idênticas ao teste. O controlo escuro corresponde ao material biológico exposto à máxima concentração testada de PS (TBO), do coadjuvante (KI) ou de ambos, mas sem exposição à luz.

#### **2.4.1 PDI de suspensões de células**

A suspensão de células foi obtida diluindo 1:10 a cultura de trabalho em TSB (ver secção 2.2) com tampão fosfato salino (PBS, Merck). A suspensão de células foi dividida em alíquotas e distribuída nos microcubos estéreis de polipropileno (2 mL). Aos tubos correspondentes ao teste e CE adicionou-se a solução de PS de forma a obter uma concentração final de 80  $\mu\text{M}$ . Procedeu-se à incubação das amostras durante 30 min, a 37 °C, no escuro, com agitação, de forma permitir a ligação do PS às células. Após o período de incubação no escuro, o teste e o CC foram irradiados com luz branca (400-700 nm, 150  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) durante 60 minutos (0,54  $\text{KJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) posicionando a fibra ótica na vertical sobre a amostra, mantida sob agitação magnética. O CE foi tratado de forma idêntica ao teste, mas a placa foi envolvida em folha de alumínio durante o período correspondente à irradiação.

A concentração de células viáveis foi determinada imediatamente antes (concentração inicial) e depois do período de irradiação. Procedeu-se à recolha de alíquotas de 0,5 mL e procedeu-se à sua diluição em série em PBS. De cada diluição, procedeu-se sementeira em triplicados pelo método de Miles-Misra (Miles et al., 1938). Após 24h de incubação a 37 °C, as colónias foram contadas na diluição mais adequada. A concentração de células viáveis foi calculada a partir da média das réplicas, corrigida para o fator de diluição e para o volume da alíquota e expressa como unidades formadoras de colónias por mililitro ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

#### **2.4.2 PDI de biofilmes: ensaios *in vitro***

Para a preparação de biofilmes, alíquotas de 1 mL da cultura de trabalho em fase exponencial foram transferidas para microcubos de polipropileno (2 mL) estéreis. As culturas foram incubadas em estufa, 37 °C durante 24 h, sem agitação, para permitir a fixação das células à superfície interna dos microtubos. Após este período, o meio líquido contendo as células não aderentes, foi descartado. Os biofilmes foram lavados suavemente com PBS e a cada microtubo foi adicionado 1 mL de TSB. Após 48 h de incubação a 37 °C, sem agitação, o meio de cultura foi removido e procedeu-se

novamente à lavagem dos biofilmes com 1 mL de PBS de forma a remover células não aderentes (células planctónicas). Após a lavagem, adicionou-se 1 mL de PBS a cada microtubo, e volumes adequados das soluções de TBO e KI para obter concentrações finais de 1, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  de TBO e 1, 10, 50 e 100 mM de KI (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações de TBO e KI testadas nos ensaios *in vitro* de PDI de biofilmes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

TBO ( $\mu\text{M}$ )	KI (mM)
1	0
5	0
10	0
50	0
100	0
1	1
5	10
5	50
5	100
10	10
10	50
10	100
50	10
50	50
50	100
100	10
100	50
100	100

Para cada condição experimental foram preparados 6 microtubos, 3 para determinação da concentração inicial de células viáveis e 3 para determinação da concentração final, após a irradiação. Todos os microtubos foram incubados no escuro, durante 30 minutos, a 37 °C na presença do PS e do KI. Seguidamente, as tampas foram cortadas para evitar o sombreamento e o interior dos microtubos foi irradiado durante 60 min com luz branca (400-700 nm, 150  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Os controlos escuros foram submetidos às mesmas condições que os testes mantendo os microtubos ao abrigo da luz durante o período correspondente à irradiação. Para determinação da concentração de células

viáveis, foram recolhidos 3 microtubos de cada tratamento experimental antes (concentração inicial), ou depois da irradiação (concentração final). Procedeu-se à sonicação dos microtubos durante 90 segundos num banho de ultrassons (Silvercrest®), para ressuspensão do biofilmes, e à homogeneização da suspensão no vórtex durante 60 segundos. De cada microtubo, recolheu-se uma alíquota de 0,5 mL, procedeu-se à diluição em série em PBS e semeou-se triplicados de cada diluição em TSA, usando o método da gota. As placas foram incubadas 24 h a 37 °C, e procedeu-se à contagem de colónias e à determinação da concentração de células viáveis tal como descrito na secção 2.4.1.

### 2.4.3 PDI de biofilmes: ensaios *ex vivo*

Para os ensaios *ex vivo*, os biofilmes de *X. citri subsp. citri* foram construídos em folhas de laranjeira, colhidas menos de 24 h antes dos ensaios. Foram escolhidas folhas saudáveis, sem marcas de infeção com microrganismos ou infestação com insetos. As folhas foram lavadas com água destilada e secas com papel de filtro. Na parte superior de cada folha, foram desenhados 3 quadrados de 4 cm<sup>2</sup> (Figura 4), com marcador indelével. Procedeu-se à esterilização das folhas por imersão numa solução de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 1% durante uma hora seguida de irradiação com ultravioleta durante 15 min em cada parte da folha.

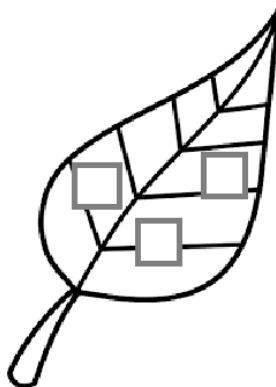


Figura 4. Representação esquemática da marcação de quadrados de área definida (4 cm<sup>2</sup>) na página superior das folhas.

Para confirmação da eficiência de esterilização, procedeu-se à amostragem da superfície de uma das folhas esterilizadas com uma zaragatoa embebida em PBS estéril. O material recolhido foi ressuspendido em 1 mL de PBS estéril, sonificado durante 90 segundos e agitado no vórtex durante 60 segundos. Após diluição em série, procedeu-se à sementeira em triplicado de cada diluição, em TSA, usando o método da gota. As placas foram incubadas 24 h a 37 °C, e procedeu-se à contagem de colónias e à determinação da concentração de células viáveis tal como descrito na secção 2.4.1.

Para obtenção dos biofilmes, as folhas previamente esterilizadas foram imersas numa suspensão de células obtida por diluição (1:10) em PBS de uma cultura fresca de *X. citri subsp. citri* em TSB, e incubadas durante 30 minutos a 37 °C. As folhas inoculadas por imersão foram transferidas individualmente para placas de petri contendo, no fundo, 15 mL de PBS e incubadas durante 48 h a 37 °C para maturação do biofilme. Sempre que necessário, adicionou-se PBS estéril ao fundo da placa para evitar a desidratação das folhas.

Após o crescimento do biofilme, as folhas correspondentes aos testes e CE foram retiradas das placas de petri, transferidas para copos de vidro contendo a solução de PS (5, 10, 20 ou 50 µM de TBO) e KI (100 mM). As folhas correspondentes aos CC foram imersas em PBS estéril. Todas as folhas foram incubadas no escuro a 37 °C durante 30 min. Foram preparadas duas folhas para cada condição experimental, uma para a determinação da concentração inicial e outra para a determinação da concentração final de células viáveis no biofilme. Após a incubação no escuro e antes da irradiação, recolheu-se uma folha de cada tratamento para determinação da concentração inicial de células viáveis. As outras folhas, foram transferidas para placas de petri contendo 15 mL de PBS estéril no fundo. As placas correspondentes aos testes e CC foram destapadas e procedeu-se à irradiação da página superior da folha com luz branca (400-700 nm, 150 mW.cm<sup>-2</sup>), durante 60 minutos. As folhas correspondentes aos CE foram mantidas ao abrigo da luz durante o período correspondente à irradiação.

Para a determinação da concentração inicial e final de células viáveis, procedeu-se à recolha do biofilme na área definida pelos quadrados marcados nas folhas, usando uma



zaragatoa estéril para cada quadrado. O material recolhido foi transferido para um microtubo contendo 1 mL de PBS, cortando o cabo da zaragatoa e deixando imersa no líquido apenas a extremidade contendo o material recolhido. As amostras foram sonificadas durante 90 segundos e agitadas no vórtex durante 60 segundos. A suspensão de células de cada microtubo foi diluída em série em PBS. As diferentes diluições foram semeadas em triplicado em TSA pela técnica da gota. Após 24h de incubação a 37 °C, as colónias foram contadas na diluição mais adequada e procedeu-se à determinação da concentração de células viáveis como descrito na secção 2.4.1.

#### **2.4.4 PDI de biofilmes com radiação solar natural**

Para os ensaios *ex vivo* com radiação solar natural, adotou-se um procedimento idêntico ao descrito na secção 2.4.3. As placas correspondentes aos testes e CC foram destapadas, colocadas junto a uma janela bem iluminada e expostas à luz solar natural indireta (irradiância 23-60 mW.cm<sup>-2</sup> medida com PowerMeter Coherent FieldMaxII-Top e sensor Coerent PowerSens PS19Q), durante 4 horas. As folhas correspondentes aos CE foram mantidas ao abrigo da luz durante o período correspondente à irradiação.

Para a determinação da concentração inicial e final de células viáveis, procedeu-se à recolha do biofilme e quantificação de células viáveis como descrito na secção 2.2.4.

#### **2.4.5 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada com o GraphPad Prism 7. As distribuições normais foram verificadas pelo teste de Kolmogorov – Smirnov e a homogeneidade da variância foi verificada com o teste de Brown – Forsythe. Foram realizados 3 ensaios, cada um com 3 réplicas cada. As diferenças entre os resultados foram avaliadas pelo teste de análise de variância simples (ANOVA One-Way) e pelo teste de Tukey Post Hoc. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.



## Capítulo 3 | Resultados

### 3.1. PDI de suspensões de células

A eficiência da inativação fotodinâmica das células planctónicas foi avaliada *in vitro* pela variação da concentração de células viáveis antes e depois da irradiação de suspensões *X. citri subsp. citri*. A exposição à luz branca (400-700 nm, 150 mW.cm<sup>-2</sup>) durante 60 minutos na presença de 80 µM de TBO causou uma redução de 5,9 log na concentração de células viáveis (Figura 5). No CC e CE não houve variação significativa da (ANOVA, p>0,05) relativamente à concentração inicial.

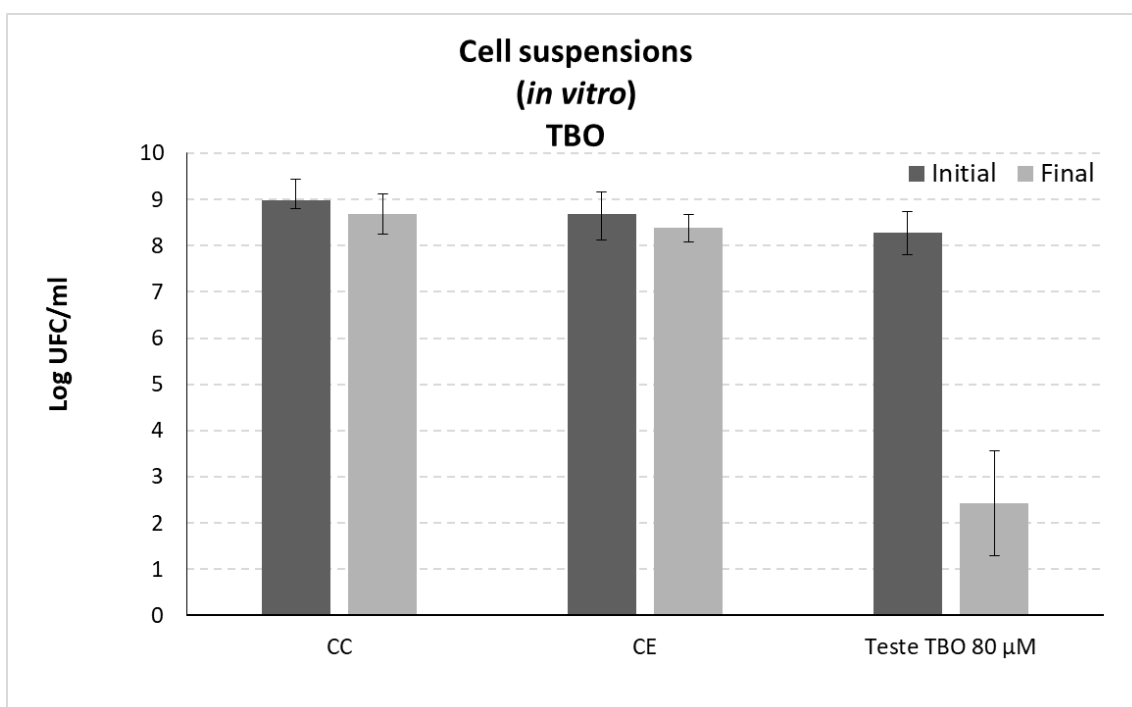


Figura 5. Inativação fotodinâmica *in vitro* de células planctónicas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com TBO (80 µM) após 60 minutos de irradiação (correspondente a dose de energia total de 540 J.cm<sup>-2</sup>) com luz branca (400-700 nm; 150 mW.cm<sup>-2</sup>). Para cada uma das condições experimentais, a primeira barra (cinzento escuro) e a segunda (cinzento claro) representam, respetivamente, a concentração inicial e a concentração final de células viáveis. CC – controlo claro; CE – controlo escuro; TBO 80 µM. As barras de erro representam o desvio padrão de 3 ensaios independentes.

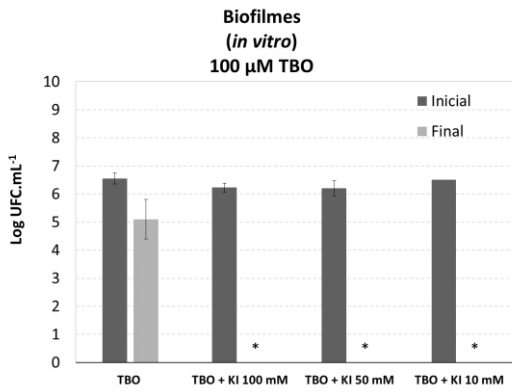
### 3.2. PDI de biofilmes: ensaios *in vitro*

Numa primeira fase, a PDI de biofilmes *X. citri subsp. citri* foi avaliada *in vitro*, em biofilmes construídos em microtubos de polipropileno, expostos a diversas concentrações de TBO (1, 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) e de KI (110 e 100 mM) (Figura 6). Na presença de 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  de TBO mas sem KI, observaram-se as respetivas reduções de 0,6; 0,9 e 1,7 log na concentração de células viáveis, após 60 min de irradiação com luz branca (400-700 nm, 150  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Nos tratamentos correspondentes a concentrações de TBO inferiores a 10  $\mu\text{M}$  (5 ou 1  $\mu\text{M}$ ) sem KI, não houve inativação significativa (ANOVA,  $p>0.05$ ).

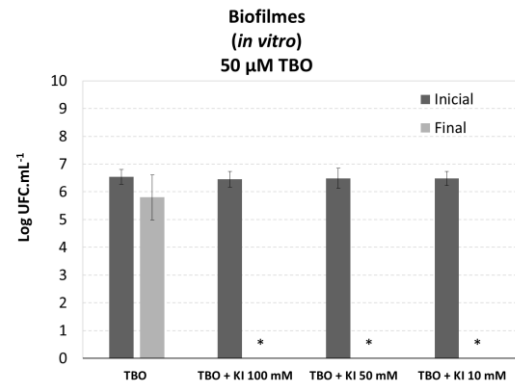
Na presença de KI houve inativação completa (fator de redução em cerca de 7 log) em todas as combinações de TBO (5, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) com KI (10, 50 ou 100 mM), exceto na combinação das concentrações mais baixas, nomeadamente a 1  $\mu\text{M}$  TBO + 1 mM KI (Figura 6 A-D). A esta concentração houve uma redução pequena (3,0 log), ainda que significativa (ANOVA,  $p<0,05$ ) da concentração de células viáveis (Figura 6 E).

Nos controlos claro e escuros não houve redução significativa da concentração de células viáveis (Figura 6 F).

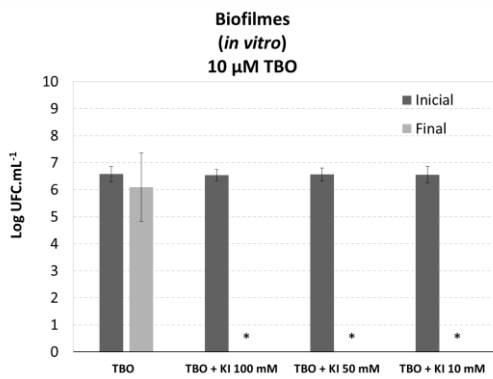
A



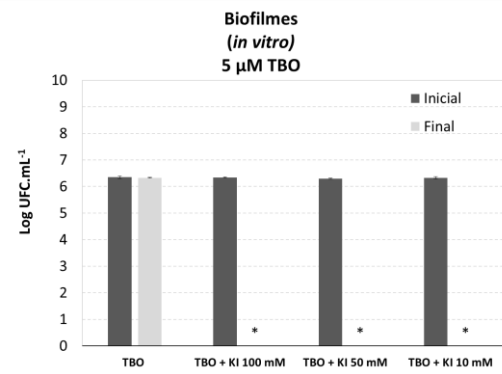
B



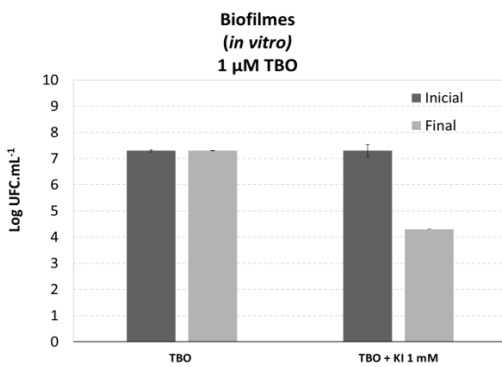
C



D



E



F

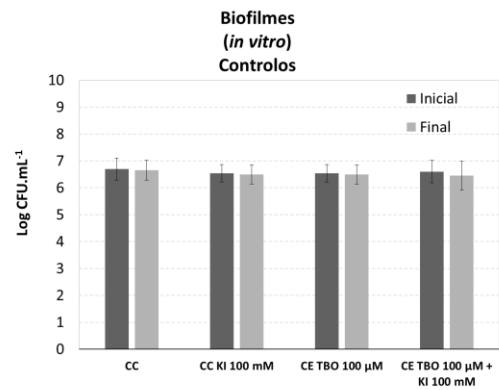


Figura 6. Inativação fotodinâmica *in vitro* de biofilmes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com combinação de diferentes concentrações de TBO (gráficos A, B, C, D e E) e diferentes concentrações de KI (100, 50, 10 ou 1  $\mu$ M), após 60 minutos de irradiação (correspondente a dose de energia total de 540 J.cm<sup>-2</sup>) com luz branca (400-700 nm; 150 mW.cm<sup>-2</sup>). Os controlos (claro e escuros) estão representados no gráfico F. As amostras em que houve inativação para além do limite de quantificação do método estão representadas como (\*). As barras de erro representam o desvio padrão de 3 ensaios independentes em duplicado.

### 3.3. PDI de biofilmes: ensaios *ex-vivos* com luz artificial

Numa segunda fase, a inativação de biofilmes foi testada *ex vivo*, em biofilmes construídos sobre a superfície de folhas de laranjeira (Figura 7). Na presença de 100 mM de KI houve inativação completa (~6 log) com 100, 50, 20 ou 5  $\mu\text{M}$  de TBO (Fig 7 A). A combinação de 10  $\mu\text{M}$  de TBO + 10 mM de KI resultou numa redução de 3,7 log na concentração de células viáveis. Não houve inativação significativa em nenhum dos controlos (Figura 7 B).

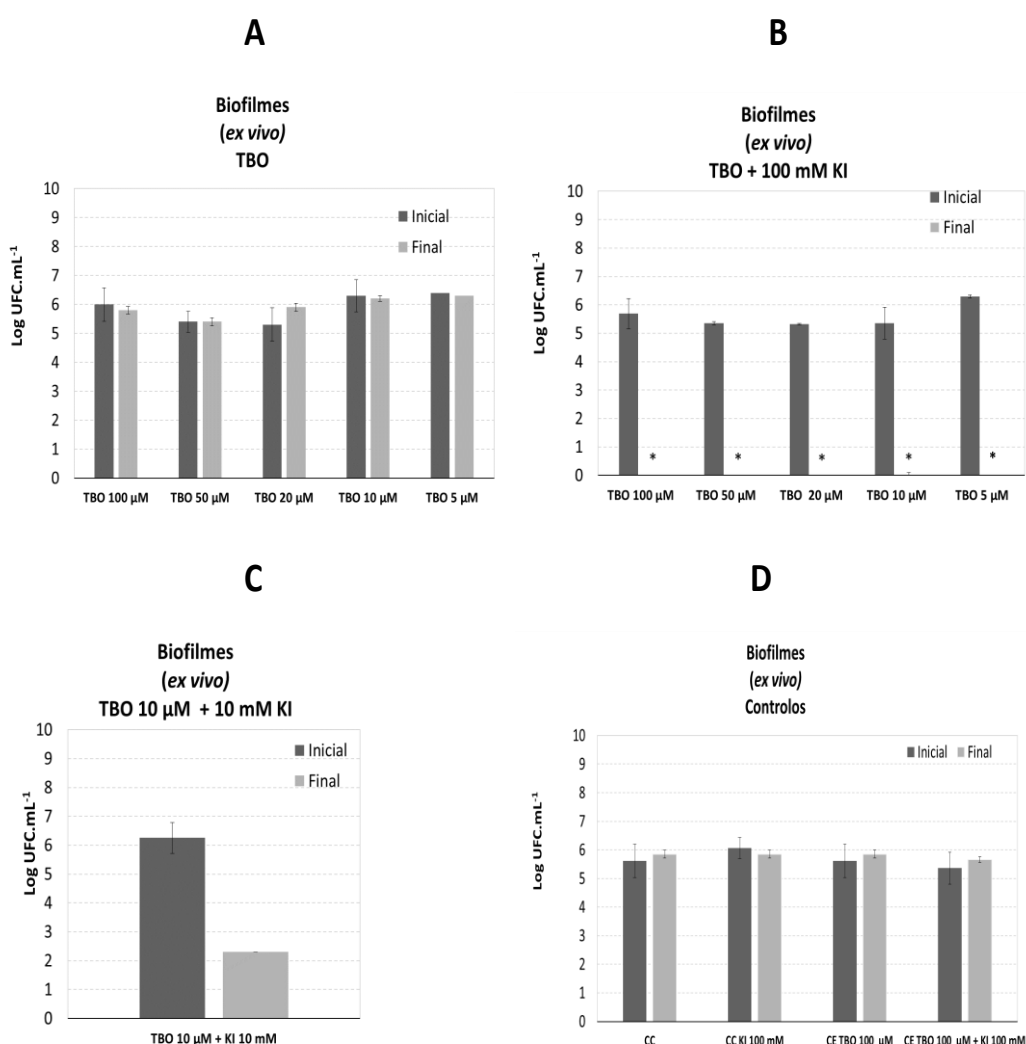


Figura 7. Inativação fotodinâmica *ex vivo* de biofilmes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em condições experimentais correspondentes à combinação de diferentes concentrações de TBO na ausência de KI (A) e com 100 mM de KI (B) após 60 minutos de irradiação (correspondente a dose de energia total de 540 J.cm<sup>-2</sup>) com luz branca (400-700 nm; 150 mW.cm<sup>-2</sup>). No gráfico C estão representados os resultados obtidos com 10

mM de KI, apenas testados com 10  $\mu\text{M}$  de TBO. Os controlos (claro e escuros) estão representados no gráfico **D**. As amostras em que houve inativação para além do limite de quantificação do método estão representadas como (\*). As barras de erro representam o desvio padrão de 3 ensaios independentes.

### 3.4. PDI de biofilmes: ensaios *ex-vivos* com luz solar natural

Nos ensaios *ex vivo* de PDI de biofilmes com luz solar natural foram testadas 3 concentrações de TBO, na ausência ou presença de 100 mM de KI. Na ausência de KI, houve reduções de 1,3 e 1,6 log, com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de TBO, respetivamente (Figura 8 A). Com o TBO a 20  $\mu\text{M}$  e na ausência de KI não ocorreu uma redução significativa (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Na presença de 100 mM de KI, houve inativação completa ( $> 6$  log) com 100 e 50  $\mu\text{M}$  de TBO e uma redução de 2,8 log com 20  $\mu\text{M}$  (Figura 8 B). Nos controlos (CC ou CE) não houve efeito significativo (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figura 8 B).

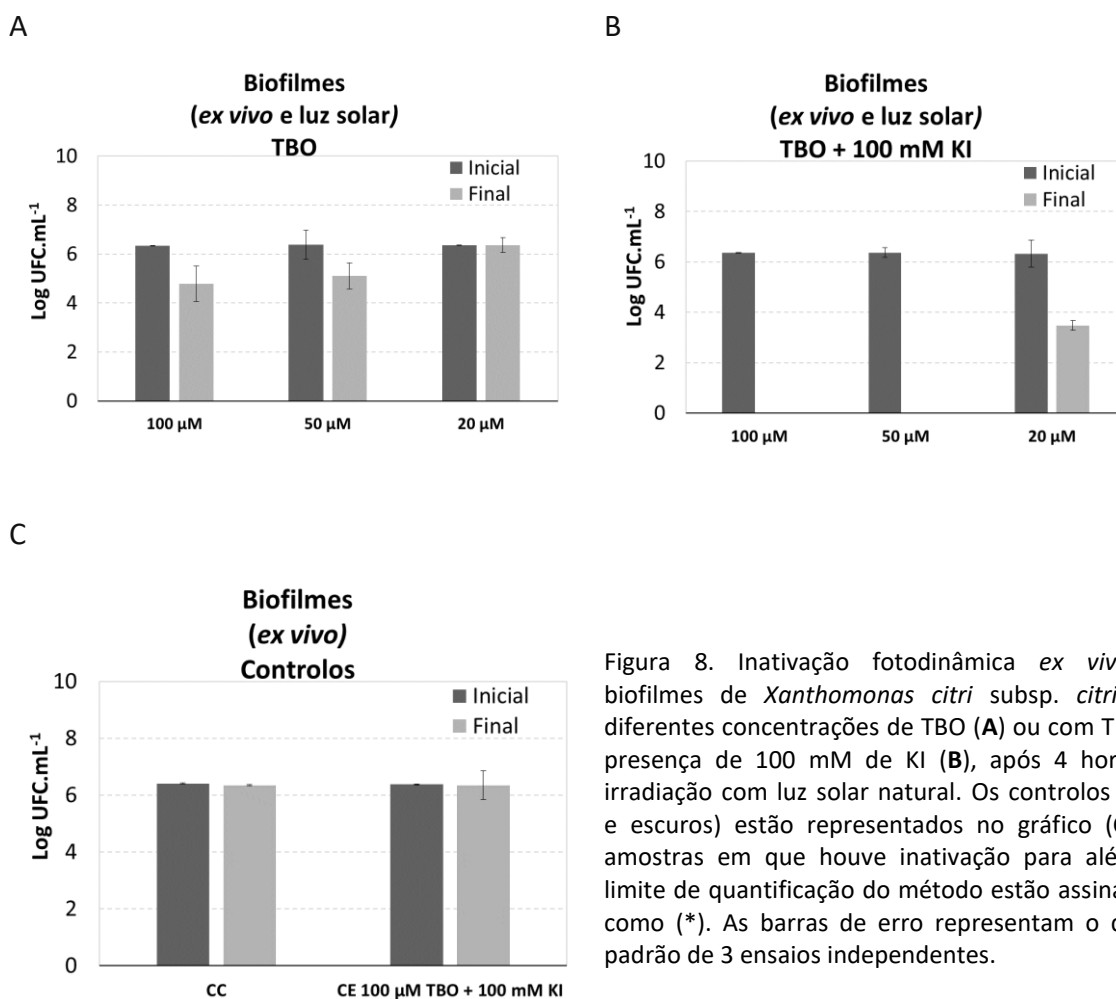


Figura 8. Inativação fotodinâmica *ex vivo* de biofilmes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com diferentes concentrações de TBO (A) ou com TBO na presença de 100 mM de KI (B), após 4 horas de irradiação com luz solar natural. Os controlos (claro e escuros) estão representados no gráfico (C). As amostras em que houve inativação para além do limite de quantificação do método estão assinaladas como (\*). As barras de erro representam o desvio padrão de 3 ensaios independentes.





## Capítulo 4 | Discussão

As quebras de produtividade de citrinos causadas por microrganismos fitopatogénicos, o acréscimo que a prevenção e tratamento de doenças representam para os custos de produção, a relativa ineficácia dos tratamentos químicos e as preocupações com efeitos colaterais no ambiente e na saúde humana têm suscitado a procura de alternativas eficientes e sustentáveis. A PDI é uma abordagem promissora no controlo de microrganismos para além do âmbito da saúde humana. No entanto, a aplicação da PDI ao controlo de bactérias fito patogénicas, está ainda pouco explorada. Resultados recentes com o agente do cancro do kiwi *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Jesus et al., 2018; Martins et al., 2018; Issawi et al., 2018) apontam para a perspetiva promissora de desenvolvimento de pesticidas fotodinâmicos. O corante TBO é um PS frequentemente usado na PDI, devido à produção moderada de oxigénio singleto, baixa toxicidade em células eucarióticas, e também por ser um composto de fácil acesso comercial e de baixo custo (Sobotta et al., 2019). Este estudo constitui, no entanto, a primeira abordagem à inativação fotodinâmica do agente do cancro cítrico *X. citri subsp. citri* com TBO.

*X. citri subsp. citri* revelou menor suscetibilidade à PDI do que outras espécies de *Xanthomonas* e outras bactérias de Gram-negativo, nomeadamente *E. coli*, usada frequentemente como modelo biológico, e *pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), outra espécie fitopatogénica. Neste trabalho, com 80  $\mu\text{M}$  de TBO com luz artificial a uma dose de luz de 0,54 K  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  houve uma redução de cerca de 6 log na concentração de células em suspensão, mas não inativação total. Num trabalho com a espécie próxima *X. anoxopodis*, 10  $\mu\text{M}$  de uma mistura de derivados catiónicos de clorina e6 e 26,6  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  de energia causaram uma redução de 7.0 log (Glueck et al., 2019). Experiências de PDI de Psa com uma porfirina catiónica produziram um fator de redução equivalente ao obtido neste trabalho (6 log) com 50  $\mu\text{M}$  de PS e uma dose de luz de 810  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Jesus et al., 2018). No entanto, uma mistura de várias porfirinas produziu uma redução maior (7,4 log) com apenas 5  $\mu\text{M}$  de PS e uma dose de luz de 14  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Martins et al., 2018). Em suspensões de *E. coli*, 44  $\mu\text{M}$  de TBO e uma dose de luz de 40  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  produziram uma inativação

superior a 8 log (Usacheva et al., 2001). A menor suscetibilidade de *X. citri subsp. citri* à PDI pode estar relacionada com mecanismos geneticamente codificados de proteção contra stresse oxidativo, importantes no processo de interação desta bactéria com os hospedeiros (Loprasert et al., 1996). Em *Xanthomonas campestris pv. campestris*, foi identificado o gene *iscR* como um regulador da transcrição associado à resistência a stresse oxidativo e à patogenicidade (Fuangthong et al., 2015). Embora na PDI de bactérias com TBO o mecanismo tipo II seja considerado preponderante (Abrahamse & Hamblin 2016) e não existam defesas celulares eficientes contra o oxigênio singleto, para além de *quencher*s e moléculas intercetoras (Forman & Fisher, 1981 ; Glaeser et al., 2011), tem também sido demonstrado que os dois mecanismos podem coexistir e atingir diferentes alvos celulares (Phoenix & Herris, 2003). Assim, a tolerância acrescida das espécies de *Xanthomonas* ao stresse oxidativo causado por outros ROS, que não o oxigênio singleto, pode constituir uma proteção contra a PDI.

Os biofilmes representam um fenótipo de resistência acrescida a várias formas de stresse, incluindo o stresse oxidativo (Gambino & Cappitelli, 2016). Entre as diferentes espécies de *Xanthomonas*, a formação de biofilmes é um traço comum aos processos de infeção (Sena-Vélez et al., 2016). Numa primeira abordagem (*in vitro*), os biofilmes de *X. citri subsp. citri*, foram construídos em microtubos de polipropileno. A PDI com 100 µM de TBO e 60 min de irradiação a 150 mW.cm<sup>2</sup> (540 J.cm<sup>-2</sup>) provocou uma redução de 1,5 log na concentração de células viáveis. Esta significativa diminuição da suscetibilidade do biofilmes à PDI, relativamente à forma livre, tem sido recorrentemente reportada e torna necessárias maiores doses de luz e concentrações de PS mais elevadas (Beirão et al., 2014; Bonifácio et al., 2018). O efeito é normalmente atribuído ao efeito de barreira da matriz extracelular, que limita o acesso do PS e do O<sub>2</sub> até às estruturas celulares alvo, e ao efeito de *quenching/scavenging* das substâncias polimérica extracelulares (Kishen 2017).

Apesar da resistência intrínseca dos biofilmes bacterianos, numerosos testes demonstram um efeito significativo da PDI com TBO, em biofilmes de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo e de fungos (Misba et al., 2017; Pinto et al., 2018). No entanto, no sentido de aumentar a eficiência, têm sido propostas várias estratégias em que a fotossensibilização é potenciada immobilizando o PS em nanopartículas ou

combinando-o com enzimas ou outros coadjuvantes. Nanopartículas com elevadas concentrações de TBO foram testadas com sucesso na erradicação de biofilmes mistos de *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Usacheva et al., 2016). Numa outra abordagem, foram usadas  $\beta$ -glucanases e DNAses para degradar componentes específicos da matriz e aumentar a penetração do PS até às células do biofilmes, o que resultou no aumento da eficiência de inativação de biofilmes da levedura *C. albicans* (Panariello et al., 2019). O iodeto de potássio (KI) tem também um efeito potenciador na inativação de biofilmes bacterianos (Ghaffari et al., 2018). Neste trabalho, foram testadas várias combinações de TBO e KI com o objetivo de definir as concentrações mínimas eficazes. Na presença de KI, ocorreu erradicação completa (fatores de redução em cerca de 7 log) em todas as combinações de TBO (5, 10, 50 e 100  $\mu$ M) e KI (10, 50 ou 100 mM) e uma redução de 3,7 log com 1  $\mu$ M de TBO e 1 mM de KI. Este efeito é semelhante ao observado com diversos PSs, em vários microrganismos-alvo, com concentrações não-tóxicas de KI. Em biofilmes de *C. albicans*, a combinação mais eficaz foi a de 100  $\mu$ M de PS (azul de metileno, MB) e 100 mM de KI (Freire et al., 2016). A PDI de biofilmes de *Enterococcus faecalis* com 100  $\mu$ M de TBO foi aumentada em cerca de 2.0 log por adição de 100 mM de KI (Ghaffari et al., 2018). Experiências em modelos murinos demonstraram o tratamento fotodinâmico de infeções por *E. coli* uropatogénica com MB foi significativamente mais eficaz na presença de KI (Huang., et al., 2018). Uma combinação 5 derivados porfirínicos (FORM) aplicado na concentração de 1  $\mu$ M na presença de 100 mM de KI erradicou completamente biofilmes de *E. coli* e *S. aureus* (Vieira et al., 2019). Os resultados dos testes de PDI *in vitro* de biofilmes de *X. citri subsp. citri* mostram que se consegue inativação completa dos biofilmes com 5  $\mu$ M de TBO e 10 mM de KI, o que corresponde a valores mais baixos do que os normalmente reportados na literatura para outras bactérias de Gram negativo.

A formação de biofilmes em frutos, caules e folhas e a penetração através dos estomas correspondem a etapas iniciais do processo de infeção de *X. citri subsp. citri* (Graham et al., 1992; Graham et al., 2016). Os ensaios *ex vivo*, em que os biofilmes foram construído sobre a superfície de folhas de laranjeira, tiveram o objetivo duplo de avaliar

se nestas condições se conseguiria atingir a mesma eficiência de inativação que nos ensaios *in vitro* e também de detetar eventuais danos na integridade das folhas.

A eficiência de inativação foi menor do que a atingida nos ensaios *in vitro*. Embora não tenha sido testada a combinação das concentrações mínimas de TBO e KI que produziram inativação completa do biofilmes *in vitro* (5  $\mu$ M de TBO e 10 mM de KI), foi testada uma combinação correspondente a uma concentração superior de PS (10  $\mu$ M TBO + 10 mM de KI) que causou uma redução de apenas 3,7 log, ou uma combinação correspondente a uma concentração mais elevada de KI (5  $\mu$ M TBO + 100 mM de KI) que não causou inativação significativa. Na presença de 100 mM de KI, obteve-se inativação completa dos biofilmes de *X. citri subsp. citri* em folhas de laranjeira tratadas com concentrações de TBO iguais ou superiores a 10  $\mu$ M. A redução da eficiência de PDI em condições *ex vivo*, comparativamente aos ensaios *in vitro*, foi também observada na experiência de PDI de Psa em folhas de kiwi (Jesus et al., 2018) e pode estar relacionada com a proteção e sombreamento causados pela micro-textura da folha e pela estrutura dos estomas. No entanto, conseguiu-se erradicação completa do biofilmes sem que fossem visíveis danos nas folhas, para além de desidratação. Num estudo em que se aplicou um tratamento com TBO (50  $\mu$ M) e irradiação com luz solar durante 15 dias a folhas de laranjeira para inativação do fungo fitopatogénico *Colletotrichum*, não foram detetados danos significativos nos tecidos das folhas (Menezes et al., 2014). Experiências com porfirinas catiónicas (Jesus et al., 2018) mostraram também que estas apresentam toxicidade negligenciável para as folhas, ao contrário de porfirinas aniónicas que podem causar morte das células vegetais (Leroy-Lhez et al., 2019). Até ao momento, não há também registo de danos causados pela aplicação de KI diretamente nas folhas, em concentrações até 100 mM.

Na perspetiva de transpor um protocolo de controle de *X. citri subsp. citri* para condições de campo, foi testada a PDI de biofilmes sobre folhas de laranjeira, com exposição à luz solar. Atendendo a que a irradiância foi mais baixa (23-60 mW.cm<sup>-2</sup>), o tempo de irradiação foi aumentado para 4 h, de modo a atingir uma dose de energia (500-600 J.cm<sup>-2</sup>) equivalente à usada nas experiências com luz artificial (540 J.cm<sup>-2</sup>).

Tal como observado nos ensaios *in vitro*, na ausência de KI o fator de redução foi < 2.0 log. Com 100 mM de KI, não houve inativação total com 20 µM de TBO, mas tal foi conseguido com 50 e 100 µM de PS. Considerando que com luz artificial se obteve uma erradicação completa dos biofilmes de *X. citri subsp. citri* das folhas com 10 µM de TBO + 100 mM de KI, a irradiação com luz solar é menos eficiente, requerendo uma concentração de PS 5 vezes superior. Este efeito pode estar relacionado com o facto de se aplicar uma potência mais baixa, biologicamente menos agressiva, ainda que durante um período mais prolongado. Nos ensaios com luz solar, também não foram detetadas lesões nas folhas, que se mantiveram frescas e sem sinais de secura durante toda a experiência, ao contrário do que aconteceu nas experiências com luz artificial de potência mais levada. Os corantes fenotiazínicos são também sensíveis à foto-redução (Koizumi et al., 1964) pelo que, tempos de irradiação prolongados podem representar uma perda efetiva de PS. No entanto, em ensaios de PDI de *Colletotrichum* em laranjeiras jovens com luz solar, em ambiente exterior, não houve necessidade de re-aplicação de TBO durante os 15 de duração da experiência (Menezes et al., 2014).

Os resultados de PDI de *X. citri subsp. citri* demonstram que esta bactéria é menos suscetível à PDI do que outras bactérias de Gram negativo, particularmente na forma de biofilmes, e que o PS (TBO) só consegue produzir uma redução significativa na concentração de células viáveis se a fotossensibilização ocorrer na presença de KI, que funciona como agente potenciador. No entanto, foi possível erradicar completamente os biofilmes formados nas folhas com 50 µM de TBO e 100 mM de KI, após 4 h de exposição à luz solar natural aplicada de forma indireta. Estes resultados permitem esperar que com luz direta, em condições de campo, possa ser conseguido o mesmo nível de eficiência com concentrações de PS inferiores. Por inspeção visual, não foram detetados danos nos tecidos das folhas, o que aponta para uma boa compatibilidade do TBO com os tecidos vegetais. No entanto, será importante avaliar também outros parâmetros que possam dar informação sobre potenciais efeitos negativos do PS na condição da planta. Neste sentido, a monitorização da fluorescência da clorofila (*PAM fluorescence*) será um parâmetro relevante para assegurar que não há comprometimento da função fotossintética. O facto de poder haver foto-redução do TBO pode até ser encarado como

uma vantagem, uma vez que reduz os riscos de acumulação no ambiente. A PDI representa assim uma perspectiva promissora, ambientalmente sustentável para o controle do cancro cítrico.

#### **4.1 Perspetivas futuras:**

Os resultados de PDI nas folhas de laranjeira, bem como a ausência de danos visuais após o tratamento, sugerem que a TFD poderá ser uma abordagem promissora e alternativa aos métodos atuais no controlo da *X. citri*.

Estudos futuros poderão de ser realizados para:

- Avaliar o efeito da PDI em *ex vivo* com tempos de irradiação mais longos sob a luz solar;
- Realizar ensaios *in vivo* de PDI em campos de cultivos de laranjas;
- Avaliar os efeitos do TBO + KI em folhas;
- Avaliar o impacto ambiental desta nova abordagem;
- Avaliar a quantidade de PS que entra nas folhas.

## Referências

- Abrahamse, H., & Hamblin, M. 2016. New photosensitizers for photodynamic therapy. *The Biochemical Journal*, 473(4):347–364.
- Almeida, A., Cunha, A., Faustino, M. A. F., Tomé, A. C., & Neves, M. G. P. M. S. 2011. “Chapter 5: Porphyrins as Antimicrobial Photosensitizing Agent”. *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*. Royal Society of Chemistry. 11, 83-160.
- Almeida, A., Faustino, M. A. F., Tomé, J. P. C. 2015. Photodynamic inactivation of bacteria: finding the effective targets. *Future Medicinal Chemistry* 7(10):1221-1224.
- Almeida, J., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., Costa, L., Faustino, M. A. F., Almeida, A. 2014. Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: influence of residual antibiotics. *Photochemical & Photobiological Sciences* 13(4):626-633.
- Alves, E., Costa, L., Carvalho, C. M. B., Tome, J. P. C., Faustino, M. A., Neves, M. G. P. M. S., Tome, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A. & Almeida, A. 2009. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiology*, 9:70-83.
- Alves, E., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Cunha, A., Nadais, H., & Almeida, A. 2014. Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 22:34–57.
- Alves, E., Faustino, M. A., Neves, M. G., Cunha, A., Tome, J., & Almeida, A. 2014. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Medicinal Chemistry*, 6(2):141–164.

- Alves, F., Carmello, J. C., Mima, E. G. O., Costa, C. A. S., Bagnato, V. S., Pavarina, A. C. 2018. Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. *Medical Mycology* 57(5):609-617.
- An, S. Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F. J., He, Y. Q., Becker, A., Teper, D., Li, Y., Wang, N., Bleris, L., Tang, J. L. 2019. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*, , fuz024
- Andrade, M. C., Ribeiro, A. P. D., Dovigo, L. N., Brunetti, I. L., Giampaolo, E. T., Bagnato, V. S. & Pavarina, A. C. 2013. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Archives of Oral Biology*, 58:200-210.
- Astuti, S. D., Arifianto, D., Drantantiyas, N. D. & Nasution, A. M. Efficacy of CNC-diode laser combine with chlorophylls to eliminate *Staphylococcus aureus* biofilm. 2016. International Seminar on Sensors, Instrumentation, Measurement and Metrology (ISSIMM), 2016. IEEE, 57-61.
- Azevedo, C. 2003. Sistema de produção de citros para o Nordeste. Embrapa Mandioca e Fruticultura Sistema de Produção, 16. ISSN 1678-8796. Disponível em <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/doencas.htm>
- Bacellar, I. O. L., Pavani, C., Sales, E. M., Itri, R., Wainwright, M. & Baptista, M. S. 2014. Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. *Photochemistry and Photobiology*, 90:801-813.
- Behlau, F., Belasque, J. 2014. Cancro cítrico: a doença e seu controle. Araraquara, Brazil: Fundecitrus.
- Behlau, F., Hong, J.C., Jones, J.B., Graham, J.H. 2013. Evidence for acquisition of copperresistance genes from different sources in citrus-associated *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 103:409-418.
- Beirão, S., Fernandes, S., Coelho, J., Faustino, M. A., Tomé, J. P., Neves, M. G., Tomé, A. C., Almeida, A. & Cunha, A. 2014. Photodynamic inactivation of bacterial and yeast



- biofilms with a cationic porphyrin. *Photochemistry and Photobiology*, 90:1387–1396.
- Bonifácio, D., Martins, C., David, B., Lemos, C., Neves, M., Almeida, A., Pinto, D., Faustino, M. & Cunha, A. 2018. Photodynamic inactivation of *Listeria innocua* biofilms with food - grade photosensitizers: a curcumin - rich extract of *Curcuma longa* vs commercial curcumin. *Journal of applied microbiology*, 125(1):282-294.
- Bonnett, R. 2000. Chemical aspects of photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 15, 3622-3622
- Calin, M. A. & Parasca, S. V. 2009. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Lasers in Medical Science*, 24:453-460.
- Calzavara-Pinton, P., Rossi, M. T., Sala, R. & Venturini, M. 2012. Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochemistry and Photobiology*, 88:512-522.
- Canteros BI, Rybak M, Gochez A, Velazquez P, Rivadeneira M, Mitidieri M, Garran S, Zequeira L. 2008. Occurrence of copper resistance in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Argentina. *Phytopathology*, 98:S30–S31
- Carrera, E., Dias, H., Corbi, S., Marcantonio, R., Bernardi, A., Bagnato, V. S., Hamblin, M. & Rastelli, A. N. D. S. 2016. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Physics*, 26:123001.
- Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. 2004. Mechanisms in photodynamic therapy: part one. *Photodiagnosis & Photodynamic Therapy*, 1(4):279–293.
- Castro, K. A. D. F., Moura, N. M. M., Fernandes, A., Faustino, M. A. F., Simões, M. M. Q., Cavaleiro, J. A. S., Nakagaki, S., Almeida, A., Cunha, A., Silvestre, A. J. D., Freire, C. S. R., Pinto, R. J. B. & Neves, M. D. G. P. M. S. 2017. Control of *Listeria innocua* biofilms by biocompatible photodynamic antifouling chitosan based materials. *Dyes and Pigments*, 137:265-276.
- Chillappagari, S., Seubert, A., Trip, H., Kuipers, O.P., Marahiel, M.A., Miethke, M. 2010. Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 192:2512-2524.

- Cieplik, F., Deng, D., Crielaard, W., Buchalla, W., Hellwig, E., Al-Ahmad, A. & Maisch, T. 2018. Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. *Critical Reviews in Microbiology*, 44:571-589.
- Costa, L., Carvalho, C. M. B., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, J. P. C., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., Almeida, A. 2010. Sewage bacteriophage inactivation by cationic porphyrins: Influence of light parameters. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 9(8):1126–1133.
- Costa, L., Tome, J., Neves, G., Tomé, A., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., Faustino, M. A. F. & Almeida, A. 2012. Susceptibility of non-enveloped DNA-and RNA-type viruses to photodynamic inactivation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11:1520–1523.
- Das Ghatak, P., Mathew-Steiner, S. S., Pandey, P., Roy, S., & Sen, C. K. 2018. A surfactant polymer dressing potentiates antimicrobial efficacy in biofilm disruption. *Scientific Reports*, 8(1):1–9.
- Demidova, T. N. & Hamblin, M. R. 2005. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:2329-2335.
- Dupont, C., Grass, G., Rensing, C. 2011. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance - new insights and applications. *Metallomics*, 3:1109-1118.
- Favaro, M. A., Roeschlin, R. A., Ribero, G. G., Maumary, R. L., Fernandez, L. N., Lutz, A., Sillon, M., Rista, L. M., Marano, M. R., Gariglio, N. F. 2017. Relationships between copper content in orange leaves, bacterial biofilm formation and citrus canker disease control after different copper treatments. *Crop Protection*, 92:182–189.
- Food and Agriculture Organization of The United Nations [FAOUN]. 2017. Citrus Fruit - Fresh and Processed Statistical Bulletin- 2016. Roma: FAO. Disponível em <http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf>
- Forman H.J., Fisher A.B. 1981. Antioxidant Defenses. In: Gilbert D.L. (eds) *Oxygen and Living Processes. Topics in Environmental Physiology and Medicine*. Springer, New York, NY

- Freire, F., Ferraresi, C., Jorge, A. O. C., & Hamblin, M. R. (2016). Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse model. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 159:161-168.
- Freitas, L. F., Hamblin, M. R. 2016. "Chapter 1: Antimicrobial photoinactivation with functionalized fullerenes". *Nanobiomaterials in antimicrobial therapy: Applications of nanobiomaterials*. Kidlington, Oxford, UK. 1-27
- Fuangthong, M., T. Jittawuttipoka, R. Wisitkamol, A. Romsang, J. Duang-nkern, P. Vattanaviboon and S. Mongkolsuk 2015. IscR plays a role in oxidative stress resistance and pathogenicity of a plant pathogen, *Xanthomonas campestris*. *Microbiological Research* 170:139-146.
- Gambino, M., Cappitelli, F. 2016. Mini-review: biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling*, 32(2):167-178.
- Ghaffari, S., Sarp, A. S. K., Lange, D., & Gülsoy, M. 2018. Potassium iodide potentiated photodynamic inactivation of enterococcus faecalis using toluidine blue: comparative analysis and post-treatment biofilm formation study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 24:245-249.
- Ghate, V. S., Zhou, W. and Yuk, H. G. 2019. Perspectives and trends in the application of photodynamic inactivation for microbiological food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18: 402-424.
- Glaeser, J., A. M. Nuss, B. A. Berghoff and G. Klug 2011. Chapter 4 - Singlet Oxygen Stress in Microorganisms. *Advances in Microbial Physiology*. R. K. Poole, Academic Press. 58: 141-173.
- Glueck, M., C. Hamminger, M. Fefer, J. Liu and K. Plaetzer 2019. Save the crop: Photodynamic Inactivation of plant pathogens I: Bacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences* 18(7):1700-1708.
- Gomes, M. C., Woranovicz-Barreira, S. M., Faustino, M. A. F., Fernandes, R., Neves, M. G. P. M. S., Tome, A. C., Gomes, N. C. M., Almeida, A., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A. & Tome, J. P. C. 2011. Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10:1735-1743.

- Gonçalves-Zuliani, A., Nunes, W., Zanutto, C., Filho, J., Nocchi, P. 2015. Evaluation of susceptibility of “pêra” sweet orange genotypes to citrus canker under field and greenhouse conditions. *Acta Horticulturae* 62(1065):511-516.
- Gonzales, J. C., G. T. Brancini, G. B. Rodrigues, G. J. Silva-Junior, L. Bachmann, M. Wainwright and G. Ú. Braga 2017. Photodynamic inactivation of conidia of the fungus *Colletotrichum abscissum* on *Citrus sinensis* plants with methylene blue under solar radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 176:54-6.
- Gottwald, T. R., Graham, J. H., & Schubert, T. S. 2002. Citrus canker: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*.
- Graham, J. H. and M. E. Myers 2016. Evaluation of soil applied systemic acquired resistance inducers integrated with copper bactericide sprays for control of citrus canker on bearing grapefruit trees. *Crop Protection* 90:157-162.
- Graham, J. H., Johnson, E. G., Myers, M. E., Young, M., Rajasekaran, P., Das, S., Santra, S. 2016. Potential of nano-formulated zinc oxide for control of citrus canker on grapefruit trees. *Plant Disease* 100(12):2442-2447.
- Graham, J., Gottwald, T., Riley, T., & Achor, D. 1992. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. *Phytopathology*, 82(11):1319-1325.
- Hamblin, M. R. & Hasan, T. 2004. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3:436-450.
- Hotze, E. M., Badireddy, A. R., Chellam, S. & Wiesner, M. R. 2009. Mechanisms of bacteriophage inactivation via singlet oxygen generation in UV illuminated fullerol suspensions. *Environmental Science & Technology*, 43:6639-6645.
- Huang, L., Bhayana, B., Xuan, W., P. Sanchez, R., J. McCulloch, B., Lalwani, S., & Hamblin, M. 2018. Comparison of two functionalized fullerenes for antimicrobial photodynamic inactivation: Potentiation by potassium iodide and photochemical mechanisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*:186, 197-206.

- Huang, L., Elhussein, A., Xuan, W., & Hamblin, M. 2017. Potentiation by potassium iodide reveals that the anionic porphyrin TPPS4 is a surprisingly effective photosensitizer for antimicrobial photodynamic inactivation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178:277–286.
- Huang, L., Szewczyk, G., Sarna, T., & Hamblin, M. 2017. Potassium iodide potentiates broad-spectrum antimicrobial photodynamic inactivation using Photofrin. *ACS Infectious Diseases*, 3:1–36.
- Huang, Y. Y., Wintner, A., Seed, P. C., Brauns, T., Gelfand, J. A., & Hamblin, M. R. 2018. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue and potassium iodide to treat urinary tract infection in a female rat model. *Scientific Reports*, 8(1):1–9.
- Ibrahim, Y. E., Saleh, A. A., Al-Saleh, M. A. 2017. Management of asiatic citrus canker under field conditions in Saudi Arabia using bacteriophages and acibenzolar-S-methyl. *Plant Disease* 101(5):761-765.
- Instituto Nacional da Estatística [INE]. 2018. Estatísticas agrícolas 2017. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISBN:978-989-25-0445-2
- Issawi, M., Sol, V., Riou, C. 2018. Plant photodynamic stress: what's new? *Frontiers in Plant Science*, 9:681.
- Jesus, V., Martins, D., Branco, T., Valério, N., Neves, M. G., Faustino, M. A., Reis, L., Barreal, E., Gallego, P. P. & Almeida, A. 2018. An insight into the photodynamic approach versus copper formulations in the control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwi plants. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 17(2):180-191.
- Jia, H., Zhang, Y., Orbović, V., Xu, J., White, F. F., Jones, J. B., & Wang, N. 2017. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnology Journal*, 15(7): 817–823.
- Kashef, N., Karami, S. & Djavid, G. E. 2015. Phototoxic effect of hypericin alone and in combination with acetylcysteine on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 12:186-192

- Kataoka, H., Nishie, H., Hayashi, N., Tanaka, M., Nomoto, A., Yano, S. & Joh, T. 2017. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Annals of Translational Medicine*, 5:183-183.
- Kazemi-Pour, N., Condemine, G., & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 2004. The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics*, 10:3177–3186.
- Ke, M.-R., Eastel, J. M., Ngai, K. L., Cheung, Y.-Y., Chan, P. K., Hui, M., Ng, D. K. & Lo, P.-C. 2014. Photodynamic inactivation of bacteria and viruses using two monosubstituted zinc(II) phthalocyanines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84:278-283.
- Kessels, J. P., Nelemans, P. J., Mosterd, K., Kelleners-Smeets, N. W., Krekels, G. A. & Ostertag, J. U. 2016. Laser-mediated photodynamic therapy: an alternative treatment for actinic keratosis? *Acta Dermato-Venereologica*, 96:351-355.
- Kishen, A. 2017. “Microbial biofilms and antimicrobial photodynamic therapy”. *Imaging in photodynamic therapy* .
- Kobayashi, A.K., Vieira, L.G., Filho, J.C., Leite, R.P., Pereira, L.F., Molinari, H.B., & Marques, V.V. 2017. Enhanced resistance to citrus canker in transgenic sweet orange expressing the sarcotoxin IA gene. *European Journal of Plant Pathology*, 149:865-873..
- Koizumi, M., Obata, H., & Hayashi, S. 1964. Studies of the photoreduction of thiazine dyes in aqueous solutions. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 37(1):108-116.
- Kou, J., Dou, D. & Yang, L. 2017. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget*, 8:81591-81603.
- Lamichhane, J.R., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J. B., Aubertot, J. 2018. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 38:28-44.
- Leroy-Lhez, S., Rezazgui, O., Issawi, M., Elhabiri, M., Calliste, C. A., & Riou, C. 2019. Why are the anionic porphyrins so efficient to induce plant cell death? A structure-activity relationship study to solve the puzzle. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 368:276-289.

- Lesar, A., Begić, G., Malatesti, N., Gobin, I. 2019. Innovative approach in Legionella water treatment with photodynamic cationic amphiphilic porphyrin. *Water Supply* 19(5):1473-1479.
- Li, J. and N. Wang 2011. The *wxacO* gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. *Molecular Plant Pathology* 12(4):381-396.
- Li, J. and N. Wang 2014. Foliar application of biofilm formation-inhibiting compounds enhances control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Phytopathology* 104(2):134-142.
- Limoli, Dominique., Jones, Christopher., Wozniak, Daniel. 2015. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiology Spectrum*. 3(3). 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014.
- Lin, H., Chen, C., & Huang, C. (2004). Use of merocyanine 540 for photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(11:), 6453-6458.
- Loprasert, S., P. Vattanaviboon, W. Praituan, S. Chamnongpol and S. Mongkolsuk 1996. Regulation of the oxidative stress protective enzymes, catalase and superoxide dismutase in *Xanthomonas*—a review. *Gene* 179(1):33-37.
- Lourenço, L. M., Sousa, A., Gomes, M. C., Faustino, M. A., Almeida, A., Silva, A. M., Neves, M. G., Cavaleiro, J. A., Cunha, A. & Tomé, J. P. 2015. Inverted methoxypyridinium phthalocyanines for PDI of pathogenic bacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14:1853-1863.
- Luksiene, Z. & Brovko, L. 2013. Antibacterial photosensitization-based treatment for food safety. *Food Engineering Reviews*, 5:185-199.
- Maisch, T. 2015. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences* 14(8):1518-1526.
- Marques, A., Dionísio, L., Pallero-Bueno, F., Neto, L. 2016. Estudo da capacidade entomopatogénica de fungos fitopatogénicos. *Actas Portuguesas de Horticultura*. 25:114-119.

- Martinez A, A., Mroz, P., Thunshelle, C. & Hamblin, M. R. 2017. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chemical Biology & Drug Design*, 89:192-206
- Martins, D., Mesquita, M. Q., Neves, M. G. P. M. S., Faustino, M. A. F., Reis, L., Figueira, E., and Almeida, A., 2018. Photoinactivation of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit plants by cationic porphyrins. *Planta*. 248(2):409-421
- Mendes, B. M. J., Cardoso, S., Boscarol-Camargo, R., Cruz, R., Mourão, F., Bergamin, F. A. 2010. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. *Plant Pathology*, 59:68-75.
- Menezes, H. D., Rodrigues, G. B., de Pádua Teixeira, S., Massola, N. S., Bachmann, L., Wainwright, M., & Braga, G. U. 2014. *In vitro* photodynamic inactivation of plant-pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with novel phenothiazinium photosensitizers. *Applied & Environmental Microbiology*, 80(5):1623-1632.
- Miles, A. A., S. Misra and J. Irwin 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection* 38(6): 732-749.
- Ministério de Agricultura do Desenvolvimento Rural e Pescas [MADRP] e Gabinete de Planeamento e Políticas (GPP) (2007). Frutas, Hortícolas e Flores. Lisboa: MADRP-GPP. Disponível em [http://www.gpp.pt/images/GPP/O\\_que\\_disponibilizamos/Publicacoes/Frutas\\_Hortícolas\\_e\\_Flores\\_\\_Diagnostico\\_Sectorial.pdf](http://www.gpp.pt/images/GPP/O_que_disponibilizamos/Publicacoes/Frutas_Hortícolas_e_Flores__Diagnostico_Sectorial.pdf)
- Misba, L., Zaidi, S., & Khan, A. U. 2017. A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram negative bacterial biofilm. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 18:24-33.
- Moreira, L. M., Almeida, N. F., Potnis, N., Digiampietri, L. A., Adi, S. S., Bortolossi, J. C., ... Setubal, J. C. 2010. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. *BMC Genomics*, 11(1):238.
- Morton, C. A., Braathen, L. R. 2018. Daylight photodynamic therapy for actinic keratoses. *American Journal of Clinical Dermatology*, 19:647-656.



- O'Connor, A. E., Gallagher, W. M., Byrne, A. T. 2009. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 85:1053-1074.
- Oliveira, A., Almeida, A., Carvalho, C. M. B., Tomé, J. P. C., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., cunha, A. 2009. Porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of *Bacillus cereus* endospores. *Journal of Applied Microbiology*, 106:1986-1995.
- Oliveira, N. M., Martinez-garcia, E., Xavier, J., Durham, W. M., Kolter, R., Kim, W., Foster, K. R. 2015. Biofilm formation as a response to ecological competition. *PLoS biology*, 13:1002191.
- Olmedo, G. M., L. Cerioni, M. M. González, F. M. Cabrerizo, S. I. Volentini and V. A. Rapisarda 2017. UVA photoactivation of harmol enhances its antifungal activity against the phytopathogens *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 8:347.
- Pamp, S. J., Gjermansen, M. & Tolker-Nielsen, T. 2007. The biofilm matrix: a sticky framework, p 37–69. In Kjelleberg S, Givskov M (ed), *The Biofilm Mode of Life: Mechanisms and Adaptations*. Horizon Bioscience, Norfolk, UK
- Panariello, B. H. D., Klein, M. I., Alves, F., Pavarina, A. C. 2019. DNase increases the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilms. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 27:124-131.
- Patt, J. M., Chow, A., Meikle, W. G., Gracia, C., Jackson, M. A., Flores D., Sétamou, M., Dunlop, C. A., Avery, P. B., Hunter, W. B., Adamczyk, J. J. 2015. Efficacy of an autodisseminator of an entomopathogenic fungus, *Isaria fumosorosea*, to suppress Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, under greenhouse conditions. *Biological Control*, 88:37-45.
- Pereira, C. A., Romeiro, R. L., Costa, A. C. B. P., Machado, A. K. S., Junqueira, J. C. & Jorge, A. O. C. 2011. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an *in vitro* study. *Lasers in Medical Science*, 26:341-348.

- Pereira, M., Faustino, M. A. F., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., Almeida, A. 2014. Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin. *Photochemical & Photobiological Sciences* 13(4):680-690.
- Phoenix, D. A. and F. Harris 2003. Phenothiazinium-based photosensitizers: antibacterials of the future? *Trends in Molecular Medicine* 9(7):283-285.
- Pinto, A. P., Rosseti, I. B., Carvalho, M. L., da Silva, B. G. M., Alberto-Silva, C., & Costa, M. S. 2018. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT), using Toluidine blue O inhibits the viability of biofilm produced by *Candida albicans* at different stages of development. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 21:182-189.
- Polo, L., Segalla, A., Bertoloni, G., Jori, G., Schaffner, K., Reddi, E. 2000. Polylysine–porphycene conjugates as efficient photosensitizers for the inactivation of microbial pathogens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 59:152-158.
- Preuss, A., Zeugner, L., Hackbarth, S., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.P.M.S., Cavaleiro, J.A.S., Roeder, B. 2013. Photoinactivation of *Escherichia coli* (SURE 2) without intracellular uptake of the photosensitizer. *Journal of Applied Microbiology* 114(1):36-43.
- Pruvost, O., Boher, B., Brocherieux, C., Nicole, M. & Chiroleu, F. 2002. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in leaf lesions under tropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculum. *Phytopathology*, 92:336-346.
- Reis, É. G., Schubach, T. M., Pereira, S. A., Silva, J. N., Carvalho, B. W., Quintana, M. S., Gremião, I. D. 2016. Association of itraconazole and potassium iodide in the treatment of feline sporotrichosis: a prospective study. *Medical Mycology*, 54:684-690.
- Richard, D., Ravigné, V., Rieux, A., Facon, B., Boyer, C., Boyer, K., Grygiel, P., Javegny, S., Terville, M., Canteros, B. I., Robène, I., Vernière, C., Chabirand, A., Pruvost, O. P. Lefevre 2017. Adaptation of genetically monomorphic bacteria: evolution of

- copper resistance through multiple horizontal gene transfers of complex and versatile mobile genetic elements. *Molecular Ecology*, 26: 131-2149.
- Rigano, L. A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendín, L., Filippone, P., Torres, P. S. , Qüesta, J., Dow, J. M., Castagnaro, A. P., Vojnov, A. A., Marano, M. R. 2007. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20(10):1222-1230.
- Roeder, B., Preuß, A., Pohl, J. & Bornhuetter, T. Photodynamic inhibition of biofilm forming microorganisms on surfaces. Meeting Abstracts, 2018. The Electrochemical Society:1008-1008.
- Ryan, R. P., Vorhölter, F.-J., Potnis, N., Jones, J. B., Van Sluys, M.-A., Bogdanove, A. J. & Dow, J. M. 2011a. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 9:344-55.
- Ryberg, E. C., Chu, C. & Kim, J.-H. 2018. Edible dye-enhanced solar disinfection with safety indication. *Environmental Science & Technology*, 52:13361-13369.
- Santos, P. J., Savi, D. C., Gomes, R. R., Goulin, E. H., Costa, S. C., Tanaka, F. A. , Almeida, A. M., Galli-Terasawa, L., Kava, V., Glienke, C. 2016. *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*. *Microbiological Research* 186:153-160.
- Sena-Vélez, M., C. Redondo, J. H. Graham and J. Cubero 2016. Presence of extracellular DNA during biofilm formation by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains with different host range. *PloS One* 11(6):e0156695.
- Shafirstein, G., Bellnier, D., Oakley, E., Hamilton, S., Potasek, M., Beeson, K. & Parilov, E. 2017. Interstitial Photodynamic Therapy—A focused review. *Cancers*, 9:12.
- Singh, S., Singh, S.K., Chowdhury, I., Singh, R., 2017. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The Open Microbiology Journal* 11:53–62.
- Smijs, T. G. M., Pavel, S. 2011. The susceptibility of dermatophytes to photodynamic treatment with special focus on *Trichophyton rubrum*. *Photochemistry and Photobiology*, 87:2-13.

- Sobotta, L., Skupin-Mrugalska, P., Piskorz, J., Mielcarek J. 2019. Non-porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria. *Dyes and Pigments*, 163:337-355.
- Sun, Y., Qin, H., Yan, Z., zhao, C., Ren, J. & Qu, X. 2019. Combating biofilm associated infection in vivo: integration of quorum sensing inhibition and photodynamic treatment based on multidrug delivered hollow carbon nitride sphere. *Advanced Functional Materials*, 29:1808222.
- Tegos, G., Dai, T., Fuchs, B. B., Coleman, J. J., Prates, R. A., Astrakas, C., ST Denis, T. G., Ribeiro, M. S., Mylonakis, E. & Hamblin, M. R. 2012. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Frontiers in microbiology*, 3, 120.
- Usacheva, M., Layek, B., Nirzhor, R., Saif, S., Prabha, S. 2016. Nanoparticle-mediated photodynamic therapy for mixed biofilms. *Journal of Nanomaterials*. vol. 2016, Article ID 4752894, 11 pages
- Usacheva, M., Teichert, M., Biel, M. 2001, Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram - positive and gram - negative microorganisms. *Lasers Surg. Med.*, 29: 165-173.
- Vauterin, L., Rademaker, J., Swings, j. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology*,90(7):677-82.
- Vecchio, D., Gupta, A., Huang, L., Landi, G., Avci, P., Rodas, A., Hamblin, M. R. 2015. Bacterial photodynamic inactivation mediated by methylene blue and red light is enhanced by synergistic effect of potassium iodide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(9):5203–5212.
- Vieira, C., Gomes, A. T. P. C., Mesquita, M. Q., Moura, N. M. M., Neves, M. G. P. M. S., Faustino, M. A. F., & Almeida, A. 2018. An insight into the potentiation effect of potassium iodide on aPDT efficacy. *Frontiers in Microbiology*, 9:1–16.
- Vieira, C., Santos, A., Mesquita, M. Q., Gomes, A. T., Neves, M. G. P., Faustino, M. A. F., & Almeida, A. (2019). Advances in aPDT based on the combination of a porphyrinic formulation with potassium iodide: Effectiveness on bacteria and fungi

- planktonic/biofilm forms and viruses. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 23(04n05), 534-545.
- Villamizar, S. and J. C. Caicedo (2019). Biological control of citrus canker: new approach for disease control. *Plant Pathology and Management of Plant Diseases*. 8
- Wainwright, M. 1998. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42:13–28.
- Wainwright, M., & Crossley, K. B. 2004. Photosensitising agents - Circumventing resistance and breaking down biofilms: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 53(2):119–126.
- Wainwright, M., Maisch, T., Nonell, S., Plaetzer, K., Almeida, A., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. 2017. Photoantimicrobials—are we afraid of the light? *The Lancet Infectious Diseases*, 17(2):e49–e55.
- Wen, X., Zhang, X., Szewczyk, G., Elhussein, A., Huang, Y.-Y., Sarna, T., & Hamblin, M. 2017. Potassium iodide potentiates antimicrobial photodynamic inactivation mediated by rose bengal in *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61:1-15
- Yano, S., Hirohara, S., Obata, M., Hagiya, Y., Ogura, S., Ikeda, A., Kataoka, H., Tanaka, M., Joh, T. 2011. Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12(1):46–67.
- Young, M., More, A., Rajasekaran, P. Kumrah, P., Myers, E., Johnson, E., Graham, J., Santra, S. (2018). Fixed-Quat: an attractive nonmetal alternative to copper biocides against plant pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(50):13056-13064
- Zhang, Y., Dai, T., Wang, M., Vecchio, D., Chiang, L. Y., & Hamblin, M. R. (2015). Potentiation of antimicrobial photodynamic inactivation mediated by a cationic fullerene by added iodide: *In vitro* and *in vivo* studies. *Nanomedicine*, 10(4): 603–614.