



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

2018

**Marina Sofia Cruz
Garcia**

**Inativação fotodinâmica do fungo patogénico da
videira *Lasiodiplodia theobromae***

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.



**Marina Sofia Cruz
Garcia**

**Inativação fotodinâmica do fungo patogénico da
videira *Lasiodiplodia theobromae***

Dissertação 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 e coorientação da Doutora Maria Amparo Ferreira Faustino, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Doutora Ana Cristina Esteves, Professora Auxiliar Convidada do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Católica Portuguesa, Centro Regional de Viseu.

Este trabalho foi suportado pelo projeto P2020-PTDC/QEQ-SUP/5355/2014 e pelo Laboratório Associado CESAM - Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (UID/AMB/50017) financiado por fundos nacionais (PIDDAC) através da FCT/MCTES e cofinanciado pelo FEDER (POCI-01-0145-FEDER-007638), no âmbito do Acordo de Parceria PT2020, e Compete 2020 - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI).

o júri

presidente

Prof. Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
Investigador principal do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

vogais

Doutora Ana Peixoto Gomes
Investigadora auxiliar do CESAM – Centro de estudos do Ambiente e do Mar (arguente).

Prof.^a Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (orientadora).

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha família que sempre depositou grande confiança no meu percurso acadêmico e que proporcionaram que tudo isto fosse possível.

À minha orientadora, Dr.^a Ângela Cunha, pela sua simpatia, apoio, motivação, disponibilidade e transmissão de conhecimentos que foram extremamente importantes para a elaboração da presente dissertação.

À minha coorientadora, Dr.^a Maria Amparo Faustino, pela sua disponibilidade, auxílio e pelo fornecimento da Porfirina utilizada como fotossensibilizador.

À Professora Ana Cristina Esteves pela cedência da cultura de *Lasiodiplodia theobromae*.

Gostaria também de agradecer ao investigador Leandro Lourenço pela disponibilização de clorinas usadas como fotossensibilizadores.

A todos os meus amigos que sempre acreditaram em mim, o meu obrigada por todo o apoio, amizade e compreensão.

Palavras-chave

Inativação fotodinâmica; *Lasioidiplodia theobromae*; azul de toluidina O; azul de metileno; porfirinas; clorinas; riboflavina; biomassa; oxigénio singleto; radicais livres.

Resumo

A viticultura é uma atividade de grande importância económica por todo o mundo. Ao longo dos anos, a sustentabilidade das vinhas tem sido constantemente ameaçada por diversos fungos patogénicos causando prejuízos económicos de grande escala. Recentemente, o fungo *Lasioidiplodia theobromae* tem ganho grande notoriedade como fitopatogénico, provocando o cancro da videira e "dieback". Várias estratégias de controlo deste fungo foram já aplicadas para mitigar a sua propagação. Estas estratégias passam por ações preventivas a nível cultural, químico e biológico. No entanto, nenhuma das tentativas de controlo fitosanitário implementadas mostrou ser eficaz ou ambientalmente inóqua. Apesar de ainda não ter sido aplicada no combate a *L. theobromae*, a terapia fotodinâmica tem mostrado ser uma abordagem bastante promissora contra vários fungos fitopatogénicos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da inativação fotodinâmica, com luz solar e luz PAR contínua, de fotossensibilizadores (PSs) sintéticos comerciais [azul de toluidina O (TBO) e azul de metileno (AM)], não comerciais do tipo porfirínico [um derivado porfirínico tetracatiónico (Tetra-Py⁺-Me) e quatro clorinas catiónicas (H₂ChITPPF₁₆[SPyM]₄, ZnChITPPF₁₆[SPyM]₄, H₂ChITPPF₁₆[NPyOM]₄ e ZnChITPPF₁₆[NPyOM]₄)], e ainda a riboflavina, considerada um PS natural.

A exposição à luz solar de *L. theobromae* na presença de 1,0 e 2,0 mM de TBO e 2,66 e 5,32 mM de Riboflavina não provocou a inibição do crescimento quando o PS foi adicionado ao meio semi-sólido de aveia ou aplicado diretamente à superfície do meio de cultura. No entanto, o AM nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM reduziu o crescimento do micélio em 60% e 83%, respetivamente. Esta inibição no crescimento apenas se verificou para o método de incorporação do PS no meio semi-sólido. Com irradiação com luz branca artificial (PAR) contínua e na presença de 1,0 mM de TBO, 1,0 mM de AM, 2,66 mM de riboflavina, 50 µM dos derivados sintéticos Tetra-Py⁺-Me, H₂ChITPPF₁₆[SPyM]₄, ZnChITPPF₁₆[SPyM]₄, H₂ChITPPF₁₆[NPyOM]₄ e ZnChITPPF₁₆[NPyOM]₄ houve inibição significativa do crescimento do micélio. Esta inibição foi de 100% para o TBO, AM, Tetra-Py⁺-Me, ZnChITPPF₁₆[SPyM]₄ e H₂ChITPPF₁₆[NPyOM]₄, 99% para ZnChITPPF₁₆[NPyOM]₄, 96% para H₂ChITPPF₁₆[SPyM]₄ e 90% para a riboflavina. No entanto, em todas as situações testadas, houve recuperação do crescimento uma vez terminada a exposição à luz, passando de 100% de inibição para recuperação total após 4 dias de incubação no escuro. Na presença de 50 µM de AM ou 5,0 µM de Tetra-Py⁺-Me e irradiação contínua com luz PAR, observou-se que a produção de biomassa foi reduzida em 57% e 54%, respetivamente. O tipo de mecanismo envolvido nesta inativação fotodinâmica foi avaliado utilizando-se *scavengers* de oxigénio singleto e radicais livres. Na presença de AM, o *scavenger* azida de sódio não exerceu nenhum efeito de proteção na inativação do fungo ao contrário do D-manitol, confirmando que os radicais livres (mecanismo tipo I) são as espécies reativas de oxigénio (ROS) preponderantes na inativação fotodinâmica de *L. theobromae* com AM.

Os resultados demonstram que a inativação fotodinâmica é uma estratégia interessante para o controle de fungos fitopatogénicos mas que existem ainda dificuldades a ultrapassar, nomeadamente as relacionadas com a recuperação do fungo, uma vez interrompida a exposição à luz. Contudo, o uso de pastas, emulsões ou tintas contendo o PS nas feridas expostas de videiras infetadas pode proporcionar melhor proteção em comparação com a pulverização com soluções líquidas.

Keywords

Photodynamic inactivation; *Lasiodiplodia theobromae*; toluidine blue O; methylene blue; porphyrins; chlorines; riboflavin; biomass; singlet oxygen; free radicals.

Abstract

Viticulture is an economic activity of global relevance. Over the years, the sustainability of vineyards has been threatened by several pathogenic fungi causing large-scale economic losses. Recently, the fungus *Lasiodiplodia theobromae* has gained notoriety as the main causal agent of vine disease, triggering trunk cancer and dieback. Several control strategies have already been implemented to mitigate the spread, from preventive cultural, to chemical and biological measures. However, none of these control attempts proved to be either effective or environmentally friendly. Although it has not yet been used in *L. theobromae*, photodynamic inactivation has shown to be a very promising approach against several phytopathogenic fungi.

The objective of this work was to evaluate the efficiency of the photodynamic inactivation of *L. theobromae* with the synthetic photosensitizers (PSs) toluidine blue O (TBO) and methylene blue (MB), the cationic porphyrin (Tetra-Py⁺-Me), chlorines (H₂ChITPPF₁₆[SPyM]₄, ZnChITPPF₁₆[SPyM]₄, H₂ChITPPF₁₆[NPyOM]₄ and ZnChITPPF₁₆[NPyOM]₄) and the natural photosensitizer riboflavin, with natural sunlight and continuous PAR light irradiation. Exposure to sunlight in presence of 1,0 and 2,0 mM of TBO and 2,66 and 5.32 mM of riboflavin did not induce inhibition of *L. theobromae* growth when the PS was either added to soft oat medium or directly spread on the surface of oat agar. However, when 1,0 and 2,0 mM of MB was incorporated in the soft agar layer, there was a reduction of *L. theobromae* growth by 60% and 83%, respectively. Continuous irradiation with PAR light in presence of 1,0 mM TBO, 1,0 mM MB, 2,66 mM riboflavin, 50 μM of porphyrinic derivatives Tetra-Py⁺-Me, H₂ChITPPF₁₆[SPyM]₄, ZnChITPPF₁₆[SPyM]₄, H₂ChITPPF₁₆[NPyOM]₄ and ZnChITPPF₁₆[NPyOM]₄ inhibited mycelial growth. This inhibition was 100% for TBO, MB, Tetra-Py⁺-Me, ZnChITPPF₁₆[SPyM]₄ and H₂ChITPPF₁₆[NPyOM]₄, 99% for ZnChITPPF₁₆[NPyOM]₄, 96% for H₂ChITPPF₁₆[SPyM]₄, and 90% for riboflavin. However, once irradiation was terminated, there was a full recovery of mycelium developed during a period of 4 days of dark incubation. In the presence of 50 μM of MB and 5,0 μM of Tetra-Py⁺-Me and under continuous irradiation with PAR light, biomass production was reduced by 57% and 54%, respectively. The type of mechanism involved in the photodynamic inactivation was determined using specific scavengers. In the presence of MB, sodium azide had no protective effect on inactivation of this fungus unlike D-mannitol, confirming that free radicals (type I mechanism) are the main reactive oxygen species (ROS) involved in the photodynamic inactivation of *L. theobromae* with this PS.

The results demonstrate that the photodynamic inactivation can be an interesting strategy for the control of phytopathogenic fungi, but that there are still difficulties to overcome, namely those related to fungus regrowth upon ending light exposure. However, the use of PS-containing pastes, emulsions or paints in the exposed wounds of infected vines may provide better protection compared to pulverization with liquid solutions.

Índice

Abreviaturas.....	ii
1. Introdução.....	1
1.1 - <i>Lasiodiplodia</i> como agente patogénico da videira.....	1
1.2 – Estratégias de controlo de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> em viticultura.....	4
1.3 – Inativação fotodinâmica de agentes fitopatogénicos	6
1.4 – Objetivos	9
2. Materiais e Métodos	10
2.1 – Material biológico e condições de cultivo	10
2.2 - Preparação dos fotossensibilizadores e <i>scavengers</i> de espécies reativas de oxigénio.....	10
2.3 – Ensaio de inativação fotodinâmica usando luz solar	11
2.4 – Ensaio de inativação fotodinâmica com luz PAR artificial	12
2.5 – Estimativa do tempo de inativação completa	13
2.6 – Efeito da inativação fotodinâmica na produção de biomassa	13
2.7 – Mecanismo de inativação fotodinâmica.....	14
2.8 – Análise estatística	14
3. Resultados	14
3.1 – Ensaio de inativação fotodinâmica à luz solar.....	14
3.2 – Ensaio de inativação fotodinâmica com luz PAR.....	18
3.3 – Recuperação do crescimento após irradiação com luz PAR.....	21
3.4 – Produção de biomassa em meio líquido.....	22
3.5 – Tipo de mecanismo de inativação fotodinâmica.....	23
4. Discussão	24
5. Conclusão	31

Abreviaturas

AM	Azul de Metileno
AS	NaN_3
DM	D-manitol
DMSO	Dimetilssulfóxido
HpD	Derivado de Hematoporfirina
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
PBS	Tampão fosfato salino
PDI	Inativação fotodinâmica
PDT	Terapia fotodinâmica
PS	Fotossensibilizador
ROS	Espécies reativas de oxigénio
TBO	Azul de Toluidina O
Tetra-Py⁺-Me	Tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina

1. Introdução

1.1 - *Lasiodiplodia* como agente patogénico da videira

A viticultura é uma atividade de importante relevo económico praticada a nível global [1]. Em Portugal, o cultivo de vinha é uma das atividades socioeconómicas mais relevantes, representando cerca de 14% da área total agrícola plantada e 6% das produções totais [2]. Ocupando uma extensa área de 195 mil hectares, as vinhas portuguesas produzem 6,0 milhões de hectolitros de vinho, dos quais cerca de metade são exportados, contribuindo para um rendimento anual de 700 milhões de euros. Em 2016, Portugal foi considerado o 11º produtor mundial de vinho e o 9º exportador mundial [3-4].

A videira (*Vitis vinífera* L.) é altamente vulnerável a doenças fúngicas, bacterianas e virais que reduzem a sua longevidade e produtividade, tendo como consequência o aumento dos custos anuais de produção devido à necessidade de aplicação de medidas preventivas [5-6]. Muitas das doenças que ameaçam a sustentabilidade da viticultura por todo o mundo são causadas por fungos como *Eutypa lata*, *Phomopsis viticola*, *Phaeoconiella chlamydsopora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Diatrypella* sp., conhecidos por provocarem o declínio das videiras. No entanto, nos últimos anos as espécies de Botryosphaeriaceae têm ganho grande notoriedade como importantes agentes patogénicos de videiras [7] uma vez que maior parte dos fungos isolados das zonas sintomáticas pertencem à família Botryosphaeriaceae [8–10].

A família Botryosphaeriaceae é uma família de fungos que contém 26 géneros (www.Mycobank.org, 2017). As espécies desta família têm uma vasta distribuição geográfica. Podem ser saprófitas, endófitas e parasíticas numa grande variedade de hospedeiros lenhosos, incluindo muitas gimnospérmicas e angiospérmicas [11]. Até ao momento, são conhecidas 21 espécies de *Botryosphaeriaceae* patogénicas de videiras [12], agrupadas nos géneros *Diplodia*, *Dothiorella*, *Fusicoccum*, *Neofusicoccum*, *Lasiodiplodia* e *Spencermartinsia* [7][9][13-14]. Estas espécies são responsáveis por cancro do lenho e *dieback* das videiras, uma infeção cujos sintomas incluem necrose dos rebentos ou atraso do seu aparecimento, clorose foliar, necrose marginal das folhas, redução da vitalidade da planta, insucesso da enxertia, atrofia do crescimento, descoloração e necrose vascular do tronco e apodrecimento do fruto [7–10][13]. Para além de ser reconhecido globalmente como um fungo patogénico, vários estudos demonstraram que, em regiões de clima mais quente, *Lasiodiplodia theobromae* é a espécie de Botryosphaeriaceae mais prevalente e virulenta isolada dos cancros das videiras [6][15-18], sendo considerada o agente causal primário de cancro e *dieback* nessas vinhas [7][15-16][19].

Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griff. & Maubl. tornou-se um patógeno proeminente das videiras entre 1990 e 2000 quando câncros vasculares e *dieback* começaram a emergir nos EUA, nomeadamente nos Estados da Califórnia e Arizona [20]. Posteriormente foi associado ao declínio de videiras na África do Sul [11] Austrália [21], México [15], Argentina [22], Itália [23], Espanha [24], Iraque [16], Uruguai [25], China [17], Perú [19], Brasil [18], Turquia [26] entre outras regiões. *Lasiodiplodia theobromae* é também considerado um patógeno tropical e subtropical, infectando videiras por todo o mundo [27].

A temperatura é um fator muito importante na distribuição geográfica deste fungo. A temperatura ótima de crescimento do micélio e de germinação dos conídios de *L. theobromae* em videiras é relativamente alta, variando entre os 27-33 °C e 30-40 °C, respetivamente [14]. O facto de necessitar de elevadas temperaturas para alcançar um crescimento ótimo e esporulação explica o facto de ser raramente isolado em regiões mais frias e ser maioritariamente encontrado em regiões caracterizadas por um clima semi-árido, com invernos moderados e verões quentes [15][23][29-30]. A temperatura afeta também a produção de proteínas extracelulares, a atividade extracelular enzimática e o efeito fitotóxico de estirpes de *L. theobromae* [30][31]. Deste modo, a temperatura não só afeta a sua distribuição geográfica e prevalência, como também a sua virulência. *Lasiodiplodia theobromae* pode ser isolado de videiras que não apresentam sintomas de infeção, isto é, assintomáticas [11]. Os stresses abióticos e bióticos, como a temperatura, seca extremas, danos físicos, competição e condições climáticas extremas, podem, assim, alterar a virulência deste fungo, passando de endófito comensal a patógeno, com consequente estabelecimento da doença e aparecimento de sintomas [32]. É seguro, portanto, afirmar que as condições climáticas afetam claramente a incidência, distribuição e patogenicidade deste fungo [9-10][15][23][29]. Sob os atuais cenários de mudança climática, os aumentos previstos da temperatura podem alterar a prevalência desta espécie e consequentemente a sua virulência.

Uma das principais vias de infeção do fungo *L. theobromae* nas videiras é através das feridas recentes que resultaram da prática da poda ou de máquinas de colheita [32-33]. A primeira atividade é praticada todos os anos, geralmente entre Novembro e Fevereiro, coincidindo com a época de Inverno. Os picnídios, estruturas de reprodução assexuada onde se formam os conídios, podem ser encontrados à superfície da videira, quer em ferimentos velhos quer em material infetado, nomeadamente detritos descartados no solo que resultaram da poda e em hospedeiros alternativos nas proximidades. A elevada precipitação e humidade relativa característica desta estação são os principais fatores responsáveis pela libertação dos conídios, que posteriormente são disseminados pelo vento, infectando o xilema exposto das

feridas [11][33-35]. Por esta razão, a quantidade de inóculo no ar é maior durante o Inverno e, uma vez que a poda ocorre neste período, as feridas estão altamente suscetíveis à infecção [14][37]. Existem outros meios de disseminação de *L. theobromae* além do vento. Vetores, como insetos, também podem estar envolvidos na dispersão dos esporos. Após o período de dormência, as infecções ocorrem mais tarde na Primavera quando as temperaturas são mais favoráveis à germinação dos conídios. O dano do sistema vascular da videira devido à obstrução dos elementos do xilema e floema e a decomposição da madeira que se segue à infecção, prejudicam a translocação de água e nutrientes na planta levando ao seu declínio [38].

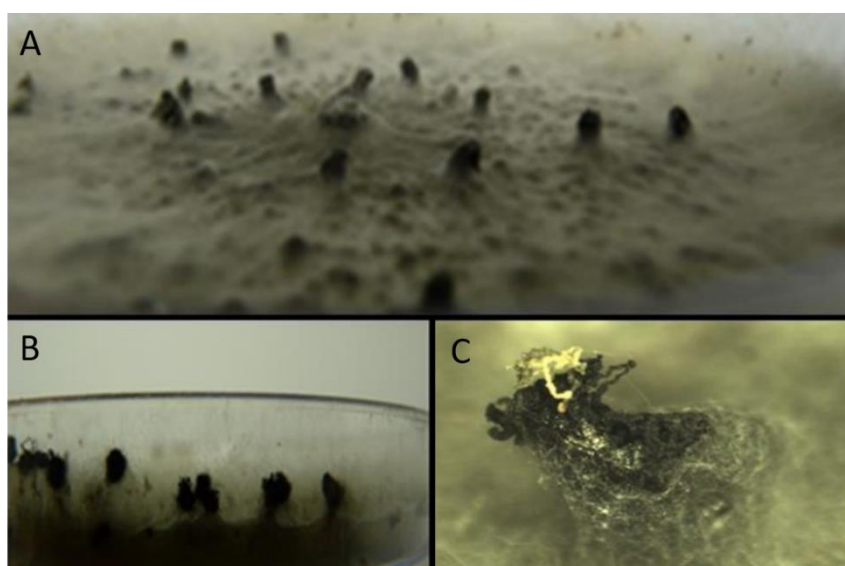


Figura 1.1 – Representação da emergência de picnídios de *Lasiodiplodia theobromae* em meio de cultura translúcido de sal-celulose (SC) (A e B) e esporulação dos picnídios à superfície do meio SC [39].

As espécies de Botryosphaeriaceae isoladas de videiras em declínio são conhecidas por produzirem metabolitos fitotóxicos que estão envolvidos na virulência que causam [38]. Por exemplo, *Diplodia seriata* produz as toxinas di-hidroisocumarina, tirosol, 4-hidroximeleína, 5-hidroximeleína e 4-hidroxibenzaldeído [40]. *Lasiodiplodia theobromae* produz o exopolissacarídeo (EPS) β -glucano [41], ácido 3-indol carboxílico (3-ICA), ácido jasmónico, lasiodiplodina, botryosphaerilactona A, di-hidrofuranonas substituídas [(3S,4R,5R)-4-hidroximetil-3,5-dimetildihidro-2-furanona, (3S,4S)- e (3R,4S)-4-acetil-3-metil-2-dihidrofuranona], meleínas (*cis*-(3R,4R)- e *trans*-(3R,4S)-4-hidroximeleína), ciclo-(Trp-Ala) e scylatone [31]. Estes metabolitos acumulam-se nas folhas e feridas, inibem os mecanismos de defesa do hospedeiro e produzem efeitos fitotóxicos como a clorose foliar [23][31].

1.2 – Estratégias de controlo de *Lasiodipodia theobromae* em viticultura

As estratégias atuais de controlo de *L. theobromae* passam, principalmente, pela integração de medidas preventivas culturais, químicas e biológicas. Uma das principais medidas preventivas culturais, aplicada por muitos viticultores, é a poda tardia realizada no fim do Inverno. O risco de infeção é menor porque a libertação dos esporos é menor devido à redução da precipitação, as temperaturas mais altas aceleram a cicatrização das feridas e a suscetibilidade das feridas diminui significativamente à medida que o intervalo de tempo entre a poda e a inoculação aumenta [14][36]. Deste modo, é reconhecido que a poda das videiras em tempo seco e quente é fundamental para a redução do risco de infeção por este agente patogénico. No entanto, a aplicação destas condições ótimas corresponde a um período curto, o que para agricultores com grandes vinhas se torna pouco prático ou mesmo inexecutável. Todavia, a ocorrência de precipitação tardia no fim do Inverno aumenta as concentrações de inóculo e atrasa as respostas fisiológicas das videiras para a reparação das feridas. Assim, apesar de ser uma estratégia integrada de gestão de pragas, a poda tardia não assegura o controlo suficiente numa vinha infetada. Outra opção igualmente viável é a redução do inóculo através de sanitização. Esta inclui a remoção cirúrgica do material infetado e necrótico da videira, mantendo apenas tecido suficiente para ocorrer a regeneração de novos ramos, bem como a sua remoção ou enterro, dado que quando é deixado no solo das vinhas torna-se uma fonte de inóculo importante [33]. Contudo, mesmo havendo sanitização, os esporos podem ser disseminados através do vento a partir de outras áreas infetadas e de hospedeiros na vizinhança. A proteção das feridas cirúrgicas e feridas da poda também é recomendável para controlar a doença. O uso de tintas resistentes que formam uma barreira física à penetração dos fungos é uma solução [33][42-43]. Contudo, estas tintas apenas fornecem uma barreira física à infeção e não protegem contra esporos que possam pousar e germinar nas superfícies expostas antes da aplicação [43]. Além disso, o uso destas tintas necessita de mão-de-obra intensiva para grandes vinhas e de várias aplicações quando há elevada precipitação, devido à pressão feita na tinta pela seiva que acaba por a destacar [33].

O controlo químico de *L. theobromae* em videiras é método mais comum praticado pelos agricultores. A aplicação dos fungicidas é feita antes do período de maior risco de infeção e os biocidas são aplicados diretamente nas feridas existentes através de *sprays* ou pastas contendo o fungicida misturado com uma tinta (ex: VAP™ – tinta acrílica de vinil) [42]. O número de produtos comercialmente disponíveis na União Europeia contra este fungo patogénico é

limitado. Os fungicidas Benomil®, Carbendazim®, Fluazinam®, Fludioxonil®, Flusilazole®, Iprodiona®, Penconazole®, Prochloraz®, Procimidona®, Tebuconazole®, Tiabendazol®, Tiofanato-metilo® são referidos na literatura como os mais eficientes na inibição do crescimento do micélio de *L. theobromae* [43-46]. No entanto, de acordo com a base de dados internacional PAN (*Pesticide Action Network*), muitos destes fungicidas, à exceção de Fluazinam®, Fludioxonil®, Penconazole®, Prochloraz®, Tebuconazole®, Tiabendazol® e Tiofanato-metilo®, estão proibidos na União Europeia ou estão sob vigilância para possível remoção (www.pan-international.org, 2018). O seu uso intensivo ou descontrolado constitui uma ameaça para a saúde pública e para o meio ambiente, uma vez que a maior parte dos fungicidas são tóxicos e não são seletivos, eliminando macro e microrganismos benéficos que são essenciais para o equilíbrio ecológico. Estes fungicidas contaminam solos e frutos podendo levar ao aparecimento de infertilidade, cancro no Homem e ao surgimento de estirpes resistentes [47-48]. Apesar do controlo químico ser o método mais eficaz contra este tipo de patogénico, não só não fornece proteção total para o período inteiro de suscetibilidade da videira como são facilmente eliminados pela chuva e têm que ser aplicados regularmente, tornando-se um processo demorado e economicamente difícil, principalmente, em extensas áreas [45]. Para evitar impactos negativos no meio ambiente e assegurar a qualidade do produto, os fungicidas químicos precisam de ser substituídos por métodos de controlo mais seguros.

O controlo biológico é uma alternativa importante para redução do uso de fungicidas nas videiras. Os agentes de controlo biológico são geralmente microrganismos que exercem um efeito antagonista no crescimento do organismo patogénico [49]. O uso destes microrganismos antagonistas e dos seus metabolitos secundários como agentes de biocontrolo, podem promover o crescimento da planta e protegê-la de infeções patogénicas [50]. O biocontrolo é alcançado direta e indiretamente por antibiose, ao lisar as células e/ou bloquear funções específicas relacionadas com o crescimento do agente patogénico, por competição de nichos e nutrientes, pela interferência com a sinalização dos patogénicos e pela indução da resistência da planta [51]. Além disso, também pode ser alcançado pela degradação dos fatores de virulência ou fitotoxinas dos patogénicos, levando à redução dos sintomas da doença [52]. Na literatura existem poucos antagonistas benéficos registados como agentes de biocontrolo de *L. theobromae* em videiras. Os metabolitos da bactéria *Bacillus subtilis* AG1 mostraram inibir *in vitro* o crescimento do micélio de *L. theobromae* por antibiose em cancos de videiras [50]. O mesmo se verifica com *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX no fruto jambo-rosa [53]. O micoparasita *Trichoderma harzianum* reduz do crescimento do micélio de *L. theobromae* em goiaba, competindo por nutrientes e espaço [54]. Apesar de oferecerem opções de controlo a

longo prazo, os agentes de controlo biológico têm que conseguir colonizar o hospedeiro antes de controlarem eficazmente a infeção [43]. A potencial alteração da microflora nativa pelos agentes de biocontrolo é outro dos problemas deste método de controlo. São ainda necessários estudos extensivos para avaliar o comportamento dos microrganismos dentro da planta, assim como a sua interação com a microflora natural [47].

1.3 – Inativação fotodinâmica de agentes fitopatogénicos

A inativação fotodinâmica (PDI) representa uma perspetiva alternativa aos agentes antifúngicos no controlo de doenças causadas por fungos patogénicos de plantas. Foi descoberta acidentalmente em 1900 pelo estudante de medicina Oscar Raab que observou que o microrganismo *Paramecium caudatum* morria quando era exposto simultaneamente ao corante acridina e luz, mas que o mesmo não acontecia quando era mantido no escuro [55]. Mais tarde, os seus supervisores verificaram que o oxigénio também era necessário para que este efeito biológico ocorresse [56]. Contudo, após a descoberta dos antibióticos em 1950 esta terapia entrou em desuso. Entre 1970 e 2010, a terapia fotodinâmica (PDT) foi focada essencialmente no tratamento de cancro e somente nos últimos anos o seu uso foi redirecionado para o combate de microrganismos patogénicos multirresistentes [57], abrangendo áreas como a medicina, agricultura e microbiologia alimentar [58-59]. Desde então, inúmeros estudos mostraram a eficácia desta técnica em bactérias, vírus, leveduras e fungos [60-63].

A ação fotodinâmica depende, assim, da interação de 3 componentes básicos: um agente fotossensibilizador (PS), uma fonte de luz e oxigénio molecular. O agente fotossensibilizador absorve luz com comprimento de onda correspondente a uma das suas bandas de absorção, passando desta forma para um estado energético superior (estado singleto excitado). Aqui pode permanecer por um período curto (nanossegundos) e regressar ao estado fundamental por emissão de luz (fluorescência) ou sofrer uma inversão do *spin* (ISC - cruzamento de intersistemas) e transformar-se num estado ainda excitado de tripleto mais estável e com tempo de vida na ordem dos microssegundos. Este tempo de vida maior permite que haja tempo suficiente para que o PS neste estado tripleto interaja com o oxigénio molecular (O₂) através de duas vias fotoquímicas diferentes, denominadas de mecanismo de Tipo I e Tipo II. O mecanismo de Tipo I envolve reações de transferência de eletrões (aceitação ou doação de eletrões para um substrato), levando à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) como sejam um anião ou catião radical. O anião radical formado pode, por exemplo, reagir com o oxigénio molecular

e gerar o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este pode sofrer uma redução formando peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que por sua vez pode formar radicais de hidroxilo ($\cdot OH$). O mecanismo de Tipo II envolve a transferência de energia entre o PS no estado tripleto excitado e oxigénio molecular, levando à formação do oxigénio singleto (1O_2) altamente reativo, retornando o PS ao seu estado fundamental (S_0) [57][64-65] (Fig. 1.2).

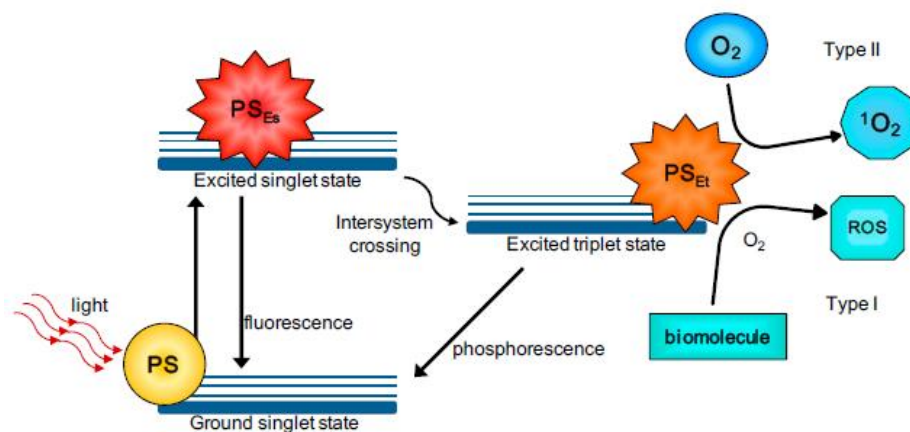


Figura 1.2 – Representação esquemática do diagrama de Jablonski mostrando os mecanismos de ação da inativação fotodinâmica [66]

Além da natureza do microrganismo ou células-alvo, a eficácia da terapia fotodinâmica depende essencialmente das características do PS e da fonte de luz. Para ser eficiente na inativação de microrganismos, o PS deve ser um composto puro e seguro, absorver a luz no espectro visível, ter uma boa produção de ROS após irradiação, não provocar toxicidade no escuro e fazer efeito a baixas concentrações [67-68]. Os PSs usados na PDT estão divididos em primeira, segunda e terceira gerações. Os de primeira geração, como o derivado de hematoporfirina (HpD) e Photofrin II (uma forma purificada de HpD) foram os primeiros a serem aplicados na terapia fotodinâmica. No entanto possuíam limitações, como composição complexa com baixa pureza química e comprimentos de onda de absorção curtos, tendo como consequência a baixa penetração dos tecidos. Além disso, não eram facilmente eliminados levando a reações prolongadas de fotossensibilidade [69-70]. Estas desvantagens levaram ao desenvolvimento de PSs de segunda geração mais puros e estáveis, com espectros de absorção melhorados, que permitiram uma maior penetração da luz nos tecidos usando menores doses de luz, e com menos efeitos adversos do que os de primeira geração [70]. A esta categoria pertencem PSs como metaloporfirinas, porfíricenos, feoforbídeos, purpurinas, ftalocianinas, naftalocianinas, clorinas, bacterioclorinas, precursores de fotoporfirina IX (PpIX), fenotiazinas

(Azul de Metileno e Azul de Toluidina O), cianinas, dipirrometenos, hipericina e xantenos (Rosa bengala) [71-72]. Os PSs de terceira geração estão a ser desenvolvidos para melhorar os resultados obtidos na terapia fotodinâmica, ao otimizar as características foto-físicas, como a geração de ROS citotóxicos e a profundidade de penetração da luz. Estes baseiam-se numa maior seletividade, sendo dirigidos a alvos intracelulares específicos. A PDT mediada por engenharia genética, nanotecnologia, anticorpos monoclonais e lipossomas são exemplos de novas abordagens [73-76].

Apesar dos fungos serem alvos mais complexos que as bactérias, o comportamento das suas células face ao processo fotodinâmico é estritamente menos controlado por fatores estruturais do que no caso das bactérias [77]. A membrana celular dos fungos é rodeada por uma parede relativamente porosa de beta-glucono, quitina e mannoпротеínas que permitem a passagem de moléculas de PSs não catiónicos (Fig. 1.3). Contudo, a parede celular e a membrana citoplasmática são carregadas negativamente, o que favorece a ligação de PSs catiónicos como Azul de Metileno (AM) e Azul de Toluidina O (TBO) [68][78-79], tornando-os mais eficientes na inativação fotodinâmica de fungos que outros PS neutros [80].

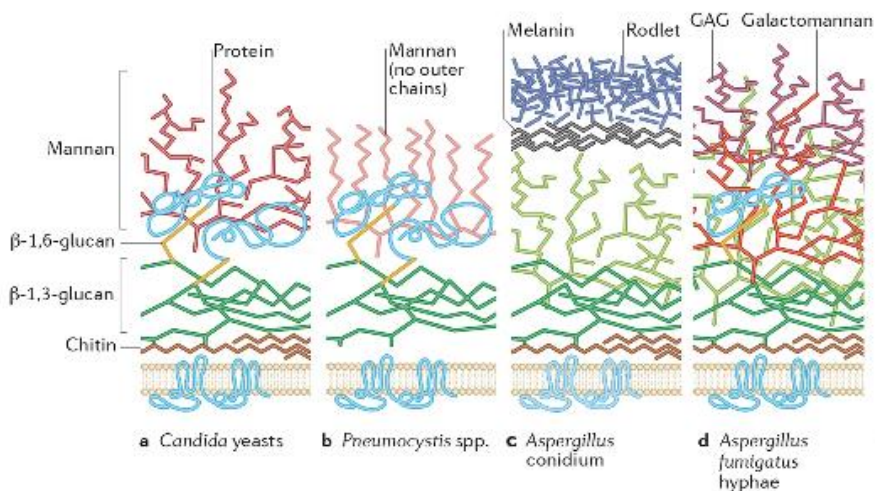


Figura 1.3 – Organização estrutural das paredes celulares de fungos patogênicos [81].

Após a absorção/adsorção do PS pelo fungo, as espécies reativas de oxigénio (ROS) causam danos oxidativos não específicos sobre diversas biomoléculas, particularmente proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, e a subsequente morte do fungo [82]. Foi já demonstrado que o oxigénio singlete (1O_2) inativa enzimas e outras proteínas e causa a peroxidação de lípidos levando à lise de membranas celulares, lisossomas e mitocôndrias [83]. Dado que os ROS

atingem diversos alvos celulares, a oportunidade de adaptação biológica e aquisição de resistência aos ROS é mínima, uma vez que não existe nenhuma defesa celular contra agentes de oxidação não específicos [67][84]. O limitado tempo de vida dos ROS limita a sua difusão e aumenta a resposta localizada, sem danificar os tecidos da planta hospedeira [62]. Assim, os PSs são menos tóxicos e agressivos para meio ambiente do que os agentes antifúngicos tradicionais [85], o que torna esta técnica de controlo bastante apelativa. No entanto, uma desvantagem importante que este tipo de tratamento antifúngico pode apresentar é o facto de não funcionar no escuro. Após cessar a iluminação, a produção de ROS também termina e é muito provável que qualquer célula microbiana que ainda esteja viva possa recuperar dos danos e voltar a proliferar novamente [84][86].

Face ao problema existente no controlo de fungos fitopatogénicos, ao risco de contaminação dos produtos agrícolas e do ambiente devido ao uso excessivo de fungicidas, ao aparecimento de estirpes tolerantes aos antifúngicos comuns e a escassa disponibilidade de antifúngicos eficientes, a inativação fotodinâmica constitui, assim, uma alternativa.

1.4 – Objetivos

Estudos anteriores demonstraram a eficiência da PDI com diferentes PSs no controlo de fungos filamentosos potencialmente patogénicos ou fitopatogénicos como *Alternaria* [87], *Aspergillus* [88], *Botrytis* [89], *Candida* [90], *Colletotrichum* [84], *Cryptococcus* [91], *Fusarium* [92], *Metarhizium* [62] e *Trichophyton* [93]. No entanto, não existe nenhum registo na literatura do seu uso em fungos do género *Lasiodiplodia*. Como tal, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial fotodinâmico de moléculas naturais e sintéticas na inativação *in vitro* do fungo *L. theobromae* quando expostas à luz solar e luz PAR contínua, verificar a propensão de recuperação do fungo após procedimento de PDI, quantificar a biomassa produzida nas condições de inativação fotodinâmica utilizadas e determinar o tipo de mecanismo de fotoinativação envolvido.

2. Materiais e Métodos

2.1 – Material biológico e condições de cultivo

A estirpe de *Lasiodiplodia theobromae* LA-SOL3 usada neste estudo foi cedido pela professora Ana Cristina Esteves (Fungal & Plant Biology Lab, CESAM, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro). A cultura foi mantida em meio de agar de aveia (30 g/L de Aveia e 15g/L de Agar), à temperatura ambiente (20-30 °C) no escuro. Antes de cada experiência, foi preparada uma nova cultura (cultura de trabalho) colocando um bloco de micélio (aprox. 6 mm de diâmetro) de uma cultura prévia à superfície de uma nova placa de meio de aveia. As culturas de trabalho foram incubadas durante 6 dias a 28 °C.

2.2 - Preparação dos fotossensibilizadores e *scavengers* de espécies reativas de oxigénio

Foram testados o PS natural Riboflavina (*Sigma*) e os PSs sintéticos comerciais Azul de Toluidina O (TBO, *Sigma-Aldrich*) e Azul de Metileno (AM, *AppliChem*), a porfirina Tetra-Py⁺-Me (Tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il) porfirina) e as clorinas (H₂ChlTPPF₁₆[SPyM]₄, ZnChlTPPF₁₆[SPyM]₄, H₂ChlTPPF₁₆[NPYOM]₄ e ZnChlTPPF₁₆[NPYOM]₄) sintetizadas no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade de Aveiro. As estruturas químicas de todos os PSs encontram-se na Fig. 2.1. As soluções de trabalho de TBO (10 mM), AM (10 mM), Tetra-Py⁺-Me (500 μM) e de cada uma das clorinas testadas (500 μM) foram preparadas usando dimetilssulfóxido (DMSO) como solvente. A solução de trabalho da Riboflavina (26,6 mM) foi preparada em água destilada. As soluções foram protegidas da luz com folha de alumínio, para evitar a fotodegradação, e conservadas a 4 °C. Antes de cada experiência, as soluções de trabalho foram homogeneizadas por sonicação durante 15 min.

As soluções de trabalho (1,0 M) de azida de sódio e D-manitol, usados como *scavengers* específicos de oxigénio singleto e radicais livres respetivamente, foram preparadas em água destilada, esterilizadas por filtração e mantidas a 4 °C.

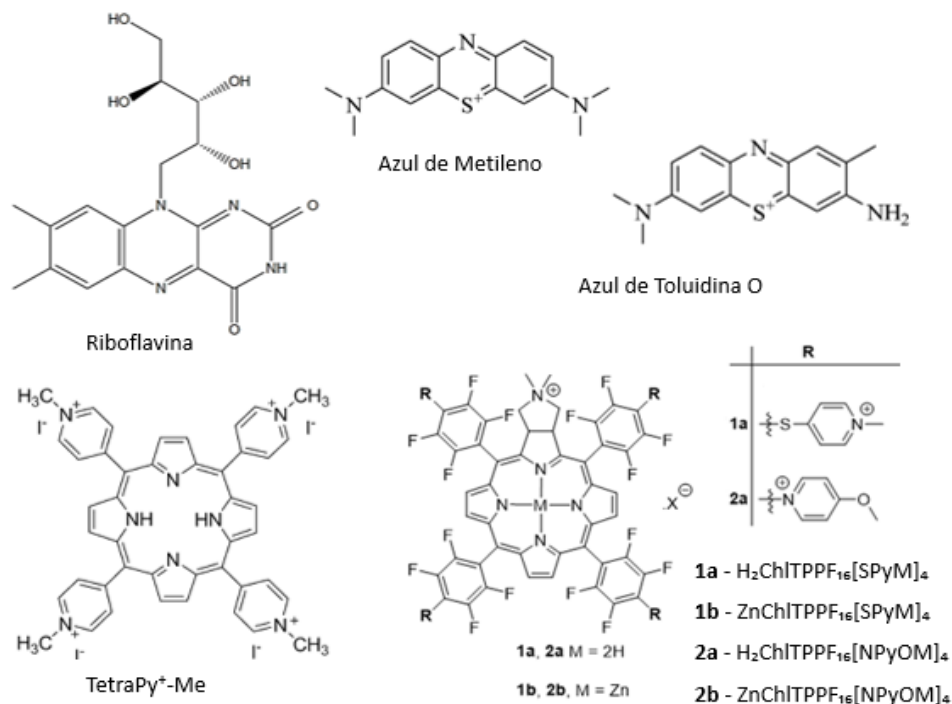


Figura 2.1 – Estrutura química dos fotossensibilizadores usados neste estudo[90][94][95].

2.3 – Ensaio de inativação fotodinâmica usando luz solar

A avaliação do efeito fotodinâmico à luz solar foi realizado somente para os PSs TBO, AM e Riboflavina. Foram testados dois desenhos experimentais para a exposição do micélio aos PSs TBO (1 mM), AM (1 mM) e Riboflavina (2,66 mM). O primeiro método (espalhamento) consistiu na adição de alíquotas de 100 µL da solução de PS diluída em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) até à concentração de trabalho à superfície do meio de cultura e espalhadas assepticamente com um espalhador. No segundo método (camada dupla) a solução de PS foi incorporada em 4 mL de meio aveia semi-sólido (5% de agar) sendo este vertido sobre meio de cultura sólido de modo a obter uma camada fina contendo o PS na concentração de trabalho. Um novo ensaio para os PSs TBO (2 mM), AM (2 mM) e Riboflavina (5,32 mM) foi realizado apenas para o primeiro método da cama dupla.

Na base das placas de cultura, foram traçados duas linhas perpendiculares e um inóculo (bloco de micélio com 6 mm de diâmetro) foi colocado no ponto de interseção (Fig. 2.2). As placas de cultura foram expostas à luz solar natural durante 7 dias (fotoperíodo natural dia e noite), à temperatura ambiente. Durante o período de incubação, procedeu-se à medição diária

do tamanho do raio das colónias, ao longo dos 4 eixos traçados na base das placas, e calculou-se o raio médio. Sempre que se observou embaciamento das tampas, procedeu-se à sua substituição por novas tampas estéreis.

Em cada ensaio foram incluídos um controlo claro, sem adição de PS mas exposto à luz, e um controlo escuro, semelhante à condição teste mas protegido da luz com folha de alumínio. Foram preparadas 5 réplicas para cada condição experimental (teste, controlo claro e controlo escuro). Cada experiência foi repetida em 3 ensaios independentes.

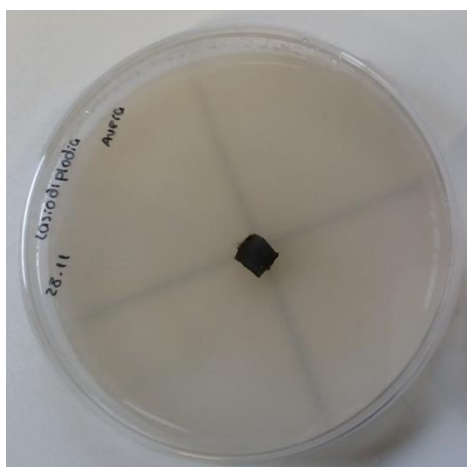


Figura 2.2 – Representação do tracejado perpendicular na base da placa de cultura e inoculação de um bloco de micélio no ponto de interseção.

2.4 – Ensaio de inativação fotodinâmica com luz PAR artificial

A avaliação do efeito fotodinâmico com luz PAR artificial (380-700 nm) foi realizada para os PSs TBO, AM, riboflavina, porfirina Tetra-Py⁺-Me, e clorinas H₂ChITPPF₁₆[SPyM]₄, ZnChITPPF₁₆[SPyM]₄, H₂ChITPPF₁₆[NPYOM]₄ e ZnChITPPF₁₆[NPYOM]₄, usando o método da dupla camada descrito na secção anterior. Foram testadas as concentrações de 1,0 mM de TBO, 1,0 mM de AM, 2,66 mM de Riboflavina, 50 µM de porfirina Tetra-Py⁺-Me e 50 µM de cada clorina em estudo. As placas correspondentes aos testes e controlos foram expostas a um alinhamento de lâmpadas fluorescentes (13 lâmpadas OSRAM 21 18W, com uma irradiância de 40 W/m²). A irradiação foi conduzida à temperatura ambiente e de forma ininterrupta, durante 24h por dia, durante 7 dias.

Durante o período de incubação, procedeu-se à medição diária do tamanho do raio das colónias, ao longo dos 4 eixos traçados na base das placas, e calculou-se o raio médio. Sempre

que se observou embaciamento das tampas, procedeu-se à sua substituição por novas tampas estéreis. Em cada ensaio foram incluídos um controlo claro, sem adição de PS mas exposto à luz, e um controlo escuro, semelhante à condição teste mas protegido da luz com folha de alumínio. Foram preparadas 5 réplicas para cada condição experimental (teste, controlo claro e controlo escuro). Cada experiência foi repetida em 3 ensaios independentes.

2.5 – Estimativa do tempo de inativação completa

Com o objetivo de determinar o tempo mínimo de exposição à luz PAR necessário para a inibição completa do crescimento do micélio de *L. theobromae*, com 1,0 mM de AM e 50 µM de porfirina Tetra-Py⁺-Me, procedeu-se a um ensaio idêntico ao descrito na secção anterior (2.4) mas em que apenas se incluiu a condição teste, e se preparou um conjunto de placas correspondentes a 5 réplicas por cada um dos 7 dias de exposição. Para cada dia, um conjunto de 5 placas foi retirado da luz e incubado no escuro a 28 °C durante 4 dias. Durante o período de incubação no escuro, procedeu-se à determinação do crescimento radial do micélio. Foram realizados 3 ensaios independentes.

2.6 – Efeito da inativação fotodinâmica na produção de biomassa

O efeito da inativação fotodinâmica com AM (50 µM) e com Tetra-Py⁺-Me (5,0 µM) na produção de biomassa de *L. theobromae* foi testado em ensaios de irradiação de culturas líquidas em caldo de aveia (meio de aveia não agarizado). Foram preparados frascos contendo 50 mL de meio, aos quais se adicionou as soluções de PS de forma a obter as concentrações de trabalho. O meio foi inoculado com blocos de micélio (6 mm de diâmetro) retirados da zona periférica das culturas de trabalho (micélio jovem). As culturas, correspondentes aos testes e controlos, foram incubadas no escuro a 28 °C durante 30 min e seguidamente foram expostas a um alinhamento de lâmpadas fluorescentes (13 lâmpadas OSRAM 21 18W, com irradiância de 40 W/m²). A irradiação foi conduzida à temperatura ambiente e de forma ininterrupta, durante 24h por dia, durante 7 dias. Em cada ensaio, foi incluído um controlo claro, sem adição de PS mas exposto às mesmas condições de luz das condições teste, e um controlo escuro, semelhante ao teste mas protegido da luz com folha de alumínio.

Após o período de incubação, o micélio foi recolhido por filtração a vácuo, em filtros de gaze estéril (Medicomp®) previamente pesados. Após a filtração, os filtros foram secos a 50 °C durante 48 h, recolhidos num exsiccador e pesados. A biomassa, expressa em peso seco de micélio, foi estimada por subtração do peso seco do filtro (antes da filtração) ao peso seco do

filtro com o micélio. Foram realizados 3 ensaios independentes para cada condição experimental (teste, controlo claro e controlo escuro), cada um com 5 réplicas.

2.7 – Mecanismo de inativação fotodinâmica

Para determinar do tipo de mecanismo (tipo I ou tipo II) envolvido na inativação fotodinâmica de *L. theobromae* com os PSs AM e Tetra-Py⁺-Me, foi testado o efeito de *scavengers* específicos de radicais livres (D-manitol) e de oxigénio singleto (azida sódica). Para tal, foi seguido um desenho experimental idêntico ao usado para avaliar a produção da biomassa (secção 2.6) em que, para além dos controlos, se incluiu a condição teste (50 µM de AM ou 5 µM de Tetra-Py⁺-Me) idêntica aos testes feitos anteriormente mas em que ao meio de cultura se adicionou também 100 µM de D-manitol ou 100 µM de azida sódica. Foram preparadas 5 réplicas para cada condição experimental.

As culturas, correspondentes aos testes e controlos, foram incubadas no escuro a 28 °C durante 30 min, irradiadas durante 7 dias e a biomassa foi determinada segundo o procedimento descrito na secção 2.6.

2.8 – Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi feita com o programa IBM SPSS 25. A significância das diferenças entre as condições testadas foi avaliada usando o teste ANOVA. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. Resultados

3.1 – Ensaio de inativação fotodinâmica à luz solar

Os resultados dos ensaios de inibição do crescimento do micélio de *L. theobromae* com os PSs TBO, AM e Riboflavina e irradiação com luz solar encontram-se representados nas figuras 3.1 e 3.2.

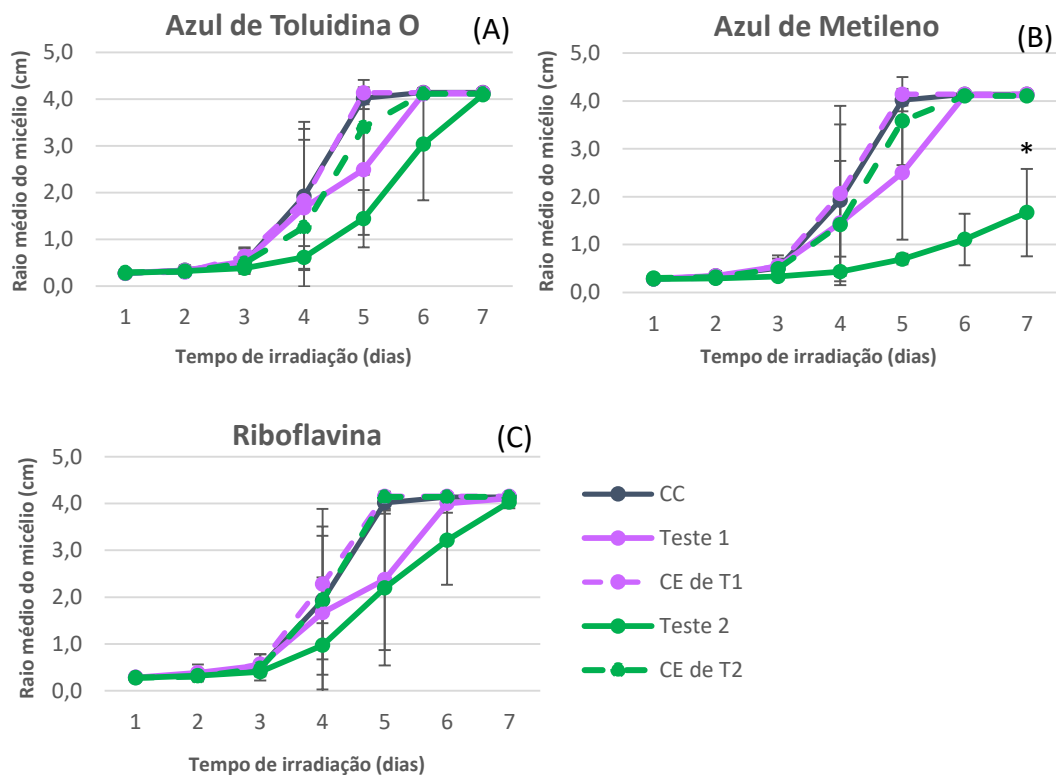


Figura 3.1 – Variação do raio médio do micélio de *Lasiodiplodia theobromae* ao longo de 7 dias de exposição a luz solar. Os ensaios foram realizados em agar de aveia com concentrações de 1,0 mM de TBO (A), 1,0 mM de AM (B) ou 2,66 mM de Riboflavina (C). O CC (controlo claro) corresponde à exposição do fungo à luz solar sem a presença de PS. O Teste 1 e Teste 2 correspondem à exposição simultânea do fungo à luz e ao PS. O Teste 1 corresponde à aplicação da solução de PS à superfície do meio sólido, por espalhamento. O Teste 2 corresponde o método da camada dupla em que o PS foi incorporado na camada superior de meio semi-sólido. Os CEs (controlos escuros) correspondem às mesmas condições que os Testes 1 e 2 sem exposição à luz. Os valores correspondem à média de 3 ensaios independentes, cada um deles com 5 réplicas e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. A significância estatística das diferenças entre as condições experimentais foi avaliada por *one-way* ANOVA. As diferenças significativas ($p < 0,05$) relativamente ao controlo claro (CC) estão assinaladas com *.

Quando aplicados diretamente à superfície do meio de cultura (T1, espalhamento), os PSs sintéticos TBO e AM (1,0 mM) e o PS natural Riboflavina (2,66 mM) não causaram inibição estatisticamente significativa do crescimento do micélio ($p > 0,05$) relativamente aos controlos (Fig. 3.1). O crescimento das colónias no CC estabilizou ao fim de 5 dias de incubação, atingindo um máximo de 4,1 cm de raio médio. Embora na condição T1, correspondente à aplicação do PS

por espalhamento, se tenha verificado um atraso no crescimento do micélio e ao 5º dia o diâmetro médio do micélio nas condições teste com TBO (38%), AM (38%) e Riboflavina (41%) fosse inferior ao controle claro, houve total recuperação do crescimento ao 6º dia de incubação e no final da experiência os valores eram idênticos aos dos controles.

Quando o PS foi incorporado na camada superior de meio semi-sólido (T2, camada dupla), os PSs TBO e Riboflavina não causaram uma inibição significativa do crescimento das colônias ($p > 0,05$, Fig. 3.1 A e C). Embora se tenha verificado um atraso no crescimento do micélio, com reduções máximas do raio médio do micélio nas condições testes atingidas ao 5º dia para TBO (65%) e Riboflavina (46%) comparativamente ao do CC, houve total recuperação do crescimento ao 7º dia de incubação. No entanto, o PS AM mostrou reduzir significativamente o crescimento do micélio quando exposto à luz solar ($p < 0,05$, Fig. 3.1 B). A redução foi máxima ao 5º dia de incubação (83% em relação ao CC) e no fim do período de incubação o raio médio do micélio da condição teste correspondia a uma redução de 60% do raio médio do CC.

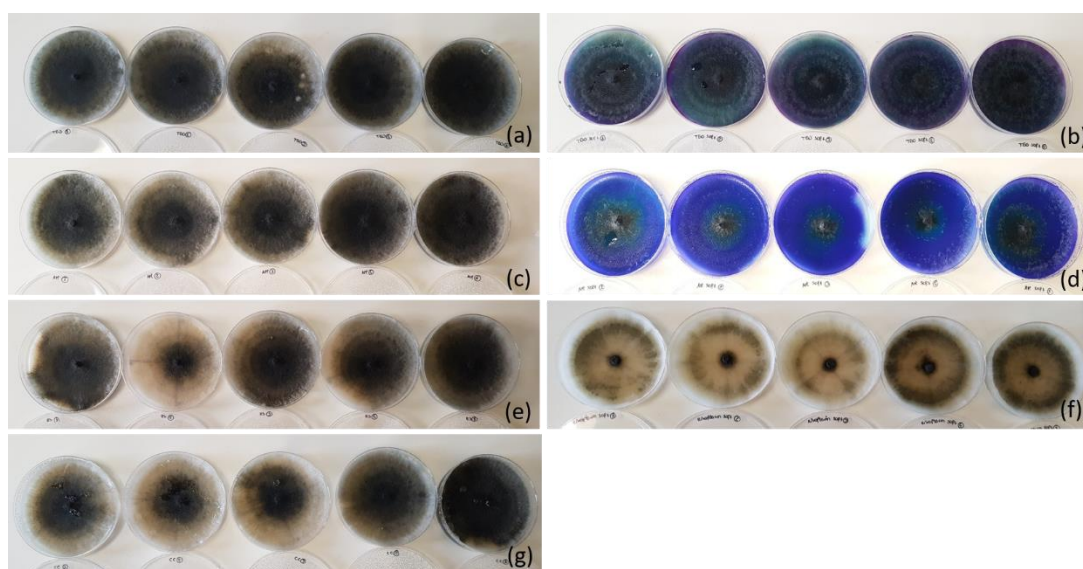


Figura 3.2 – Desenvolvimento do micélio de *Lasiodiplodia theobromae* ao fim de 7 dias de exposição à luz solar, na presença dos PSs TBO 1,0 mM (a, b), AM 1,0 mM (c, d) e Riboflavina 2,66 mM (e, f). As séries (a), (c) e (e) correspondem ao método do espalhamento (T1), as séries (b), (d) e (f) correspondem ao método da camada dupla (T2) e a série (g) corresponde ao crescimento do fungo em meio de aveia, à luz solar, sem qualquer PS adicionado (controle do crescimento).

Uma vez que se obteve maior inibição do crescimento com a incorporação do PS em meio semi-sólido (T2), esta abordagem foi usada para testar o efeito da duplicação da concentração TBO, AM e Riboflavina mantendo a irradiação com luz solar (Figs. 3.3 e 3.4). Com

TBO (2,0 mM) ou Riboflavina (5,32 mM) não houve inibição significativa do crescimento do micélio ($p > 0,05$, Fig. 3.3 A e C). O atraso no crescimento do micélio foi observado, com reduções máximas do raio médio nas condições testes ao 6º dia para TBO (48%) e ao 5º dia para a Riboflavina (28%) comparativamente ao do CC, e posterior recuperação do crescimento durante o 6º e 7º dia de incubação. Com AM (2,0 mM) verificou-se uma redução significativa do crescimento do micélio quando exposto à luz solar ($p < 0,05$, Fig. 3.3B). Esta redução foi máxima (86% em relação ao CC) ao 6º dia de incubação. No final da experiência, raio médio da condição T2 correspondia a uma redução de 83% do raio médio do CC.

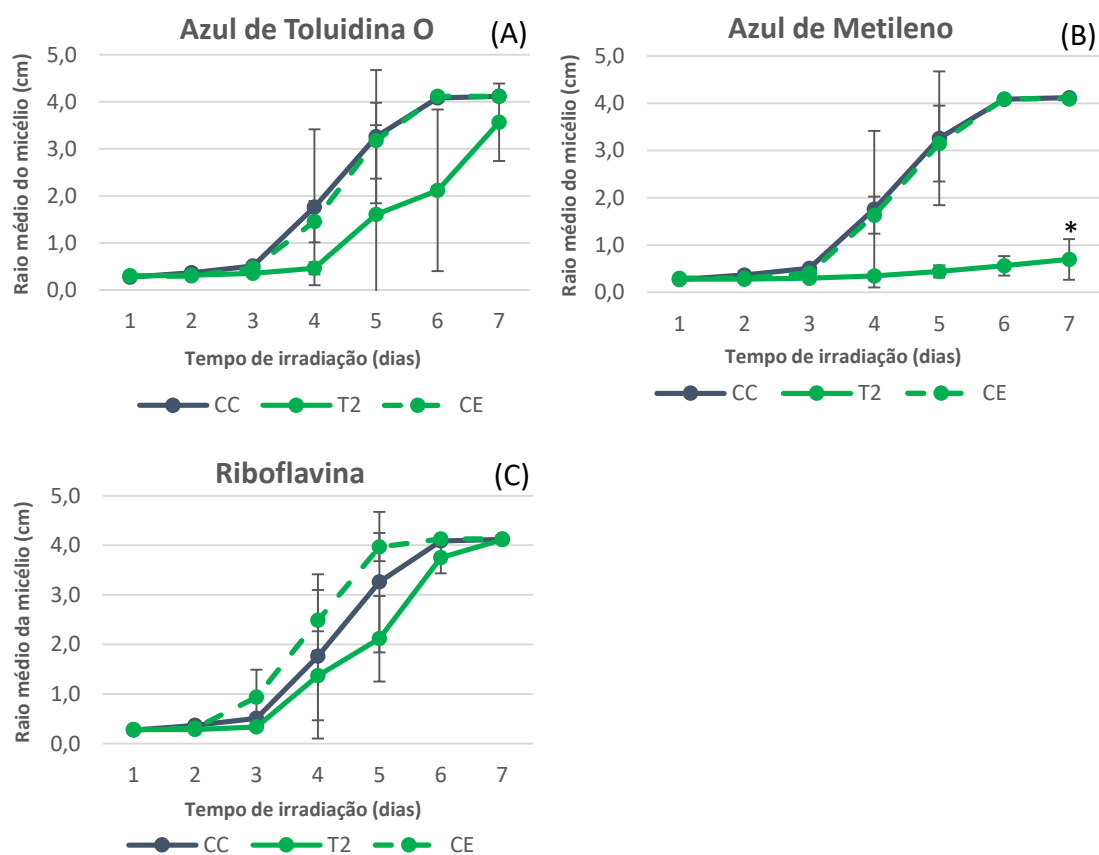


Figura 3.3 – Variação do raio médio do micélio de *Lasiodiplodia theobromae* ao longo de 7 dias de exposição à luz solar. Os ensaios foram realizados em agar de aveia com concentrações de 2,0 mM de TBO (A), 2,0 mM de AM (B) e 5,32 mM de Riboflavina (C). O CC (controle claro) corresponde à exposição do fungo à luz solar sem a presença de PS. O CE (controle escuro) corresponde às mesmas condições que o T2 (T2, método da camada dupla) sem exposição à luz. Os valores correspondem à média de 3 ensaios independentes, cada um deles com 5 réplicas e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. A significância estatística das diferenças entre as condições experimentais foi avaliada por *one-way* ANOVA. As diferenças significativas ($p < 0,05$) relativamente ao controle claro (CC) estão assinaladas com *.

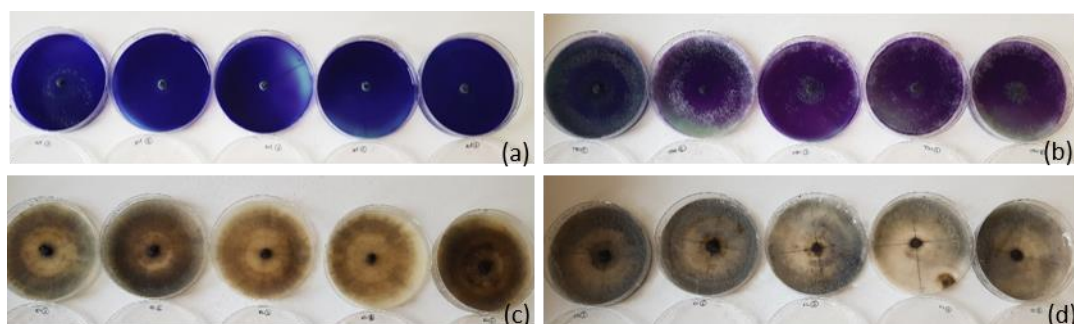


Figura 3.4 – Desenvolvimento do micélio de *Lasiodiplodia theobromae* ao fim de 7 dias de exposição à luz solar, na presença dos PSs TBO 2,0 mM (a), AM 2,0 mM (b) e Riboflavina 5,32 mM (c) aplicados pelo método da camada dupla. A série (d) corresponde ao crescimento do fungo em meio de aveia, à luz solar, sem qualquer PS adicionado (controlo do crescimento).

3.2 – Ensaio de inativação fotodinâmica com luz PAR

O efeito dos PSs TBO, AM, Riboflavina, Tetra-Py⁺-Me, e clorinas H₂ChITPPF₁₆[SPyM]₄, ZnChITPPF₁₆[SPyM]₄, H₂ChITPPF₁₆[NPyOM]₄ e ZnChITPPF₁₆[NPyOM]₄ sob luz PAR, sobre o desenvolvimento do micélio de *L. theobromae* encontram-se representados nas figuras 3.5, 3.6 e 3.7.

Os resultados correspondentes aos CC mostram que em geral, a crescimento foi mais rápido nos controlos escuros. A luz PAR na ausência de PS, atenuou em 21% ($p < 0,05$) o crescimento do micélio relativamente ao CE dos compostos TBO, AM e Riboflavina (Fig. 3.5). No final da experiência, observou-se uma inibição de 100% em relação ao CE (ausência de crescimento) para a condição teste dos PSs TBO, AM, porfirina e para as clorinas ZnChITPPF₁₆[SPyM]₄ e H₂ChITPPF₁₆[NPyOM]₄. Relativamente ao CE, verificaram-se ainda reduções significativas do raio médio do micélio ($p < 0,05$) nas condições teste dos PSs Riboflavina (90%), clorina H₂ChITPPF₁₆[SPyM]₄ (96%) e ZnChITPPF₁₆[NPyOM]₄ (99%). As diferenças de inibição no crescimento do micélio registadas entre as clorinas nas condições teste não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$). A ausência de fotoestabilidade também foi observada para estes PSs, tendo a cor do PS desaparecido do meio de cultura após 24h de exposição contínua a luz PAR.

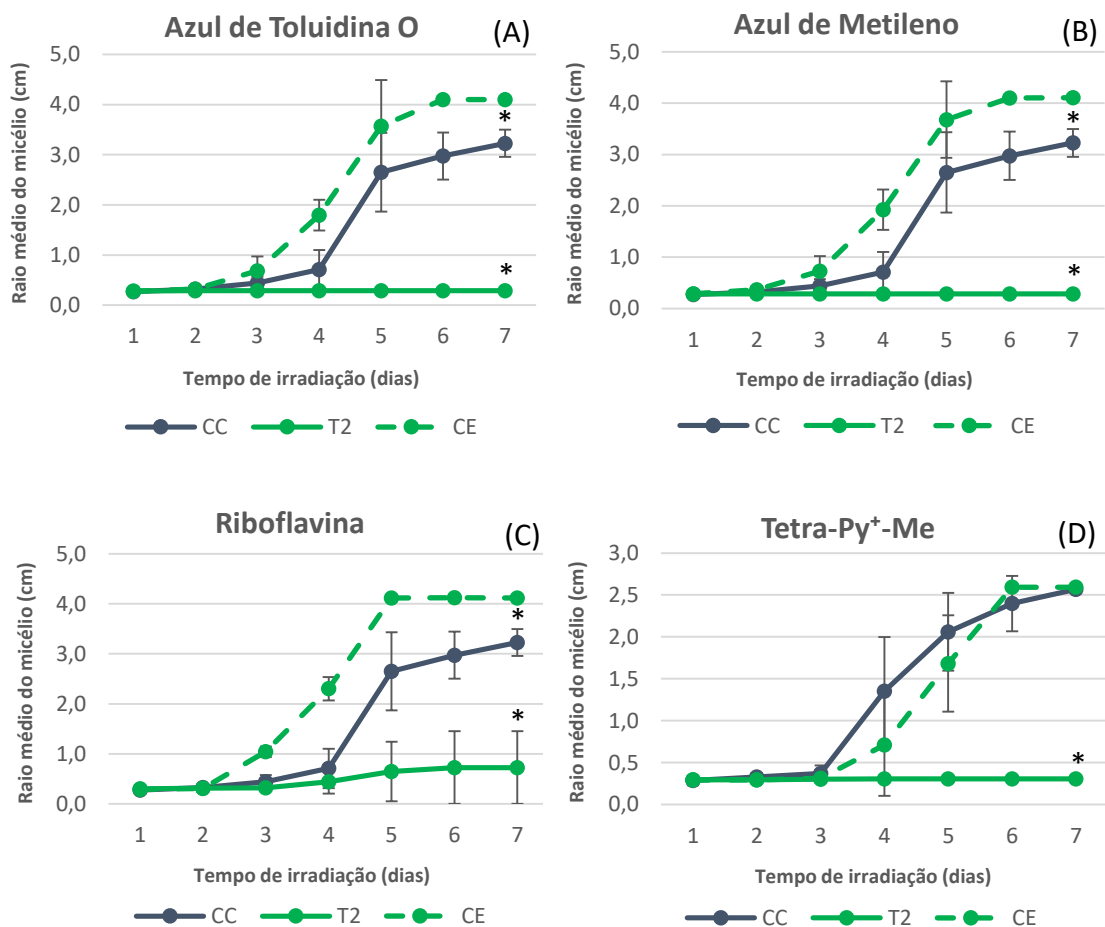


Figura 3.5 – Variação do raio médio do micélio *Lasiodiplodia theobromae* ao longo de 7 dias de irradiação contínua com luz PAR. Os ensaios foram realizados em agar de aveia com concentrações de 1,0 mM de TBO (A), 1,0 mM de AM (B) 2,66 mM de Riboflavina (C) e 50 μ M de Tetra-Py⁺-Me. O CC (controlo claro) corresponde à exposição do fungo à luz PAR sem a presença de PS. O CE (controlo escuro) corresponde às mesmas condições que o T2 (T2, método da camada dupla) sem exposição à luz. Os valores correspondem à média de 3 ensaios independentes, cada um deles com 5 réplicas e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. A significância estatística das diferenças entre as condições experimentais foi avaliada por *one-way* ANOVA. As diferenças significativas ($p < 0,05$) relativamente ao CE estão assinaladas com *.

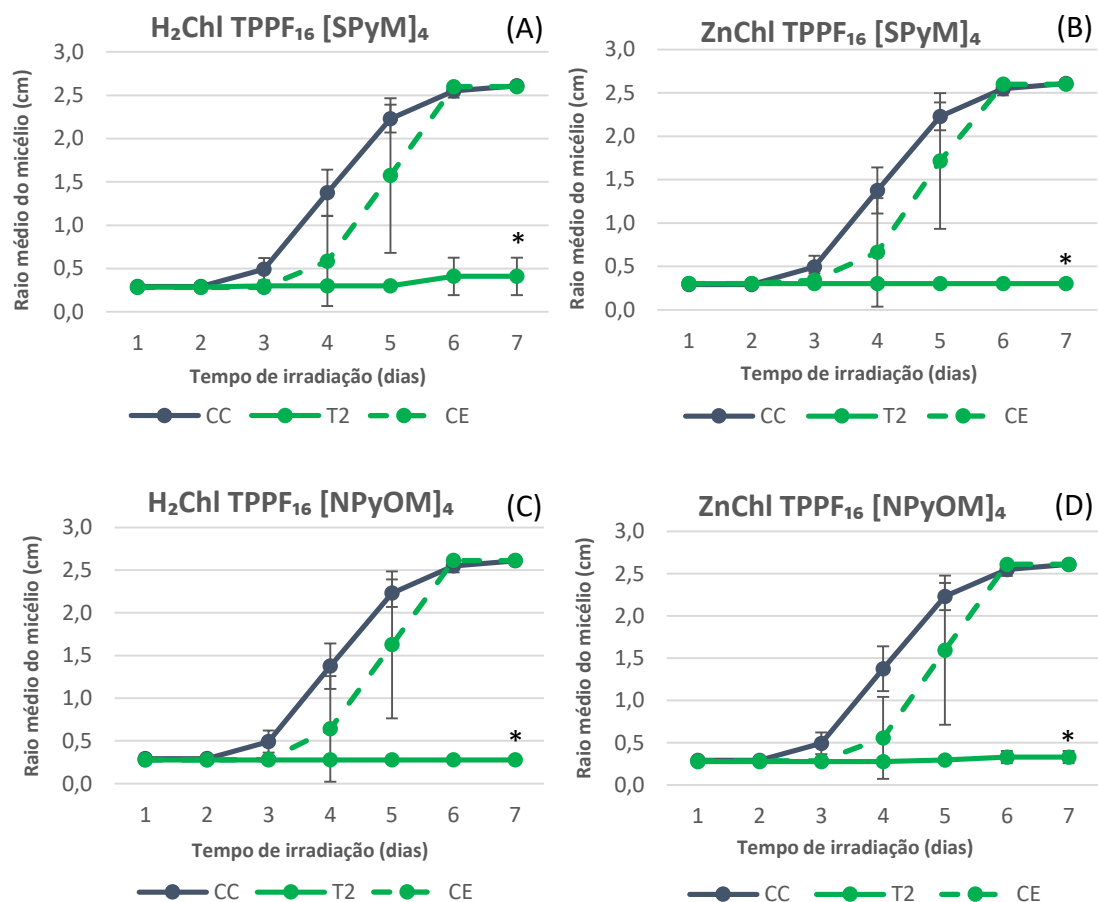


Figura 3.6 - Variação do raio médio do micélio *Lasiodiplodia theobromae* ao longo de 7 dias de irradiação contínua com luz PAR. Os ensaios foram realizados em agar de aveia com concentrações de 50 μM de H₂ChlTPPF₁₆[SPyM]₄ (A), 50 μM de ZnChlTPPF₁₆[SPyM]₄ (B) 50 μM de H₂ChlTPPF₁₆[NPyOM]₄ (C) e 50 μM de ZnChlTPPF₁₆[NPyOM]₄ (D). O CC (controlo claro) corresponde à exposição do fungo à luz PAR sem a presença de PS. O CE (controlo escuro) corresponde às mesmas condições que o T2 (T2, método da camada dupla) sem exposição à luz. Os valores correspondem à média de 3 ensaios independentes, cada um deles com 5 réplicas e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. A significância estatística das diferenças entre as condições experimentais foi avaliada por *one-way* ANOVA. As diferenças significativas ($p < 0,05$) relativamente ao CC estão assinaladas com *.

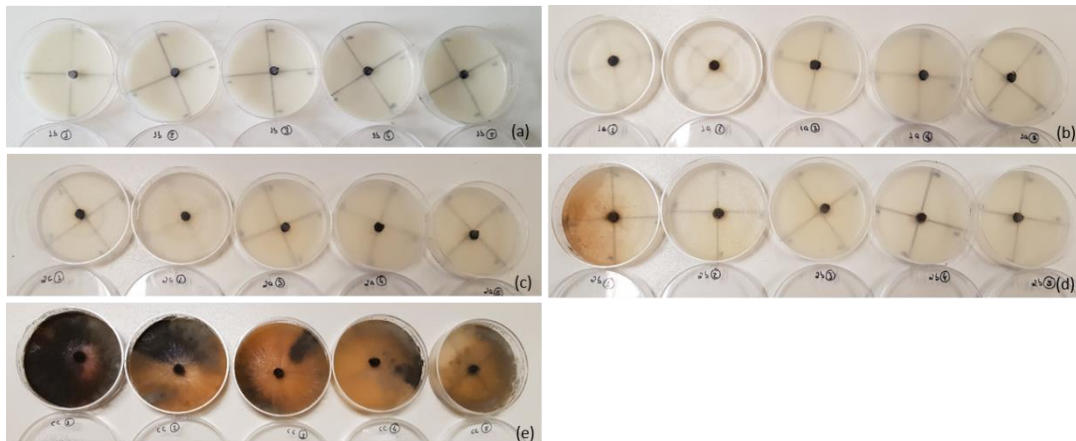


Figura 3.7 – Desenvolvimento do micélio de *Lasiodiplodia theobromae* ao fim de 7 dias de exposição contínua à luz PAR, na presença dos PSs $\text{H}_2\text{ChITPPF}_{16}[\text{SPyM}]_4$ 50 μM (b), $\text{ZnChITPPF}_{16}[\text{SPyM}]_4$ 50 μM (d) $\text{H}_2\text{ChITPPF}_{16}[\text{NPyOM}]_4$ 50 μM (f) e $\text{ZnChITPPF}_{16}[\text{NPyOM}]_4$ 50 μM (h), aplicados pelo método da camada dupla. A série (e) corresponde ao crescimento do fungo em meio de aveia, à luz PAR, sem qualquer PS adicionado (controlo do crescimento).

3.3 – Recuperação do crescimento após irradiação com luz PAR

Uma vez que nas experiências com a luz PAR os PSs AM e Tetra-Py⁺-Me causaram inibição total do crescimento do micélio de *L. theobromae*, durante os 7 dias de irradiação, foram feitas novas experiências em que para cada dia de irradiação se retirou um conjunto de placas-teste que foram seguidamente incubadas no escuro para avaliar a capacidade de recuperação do crescimento. A variação do raio médio do micélio, ao longo de 4 dias de incubação no escuro de culturas previamente irradiadas durante 1 a 7 dias, encontra-se representada na Fig. 3.8. Verificou-se que houve a recuperação do crescimento do micélio em todas as culturas, independentemente do tempo de irradiação com luz PAR.

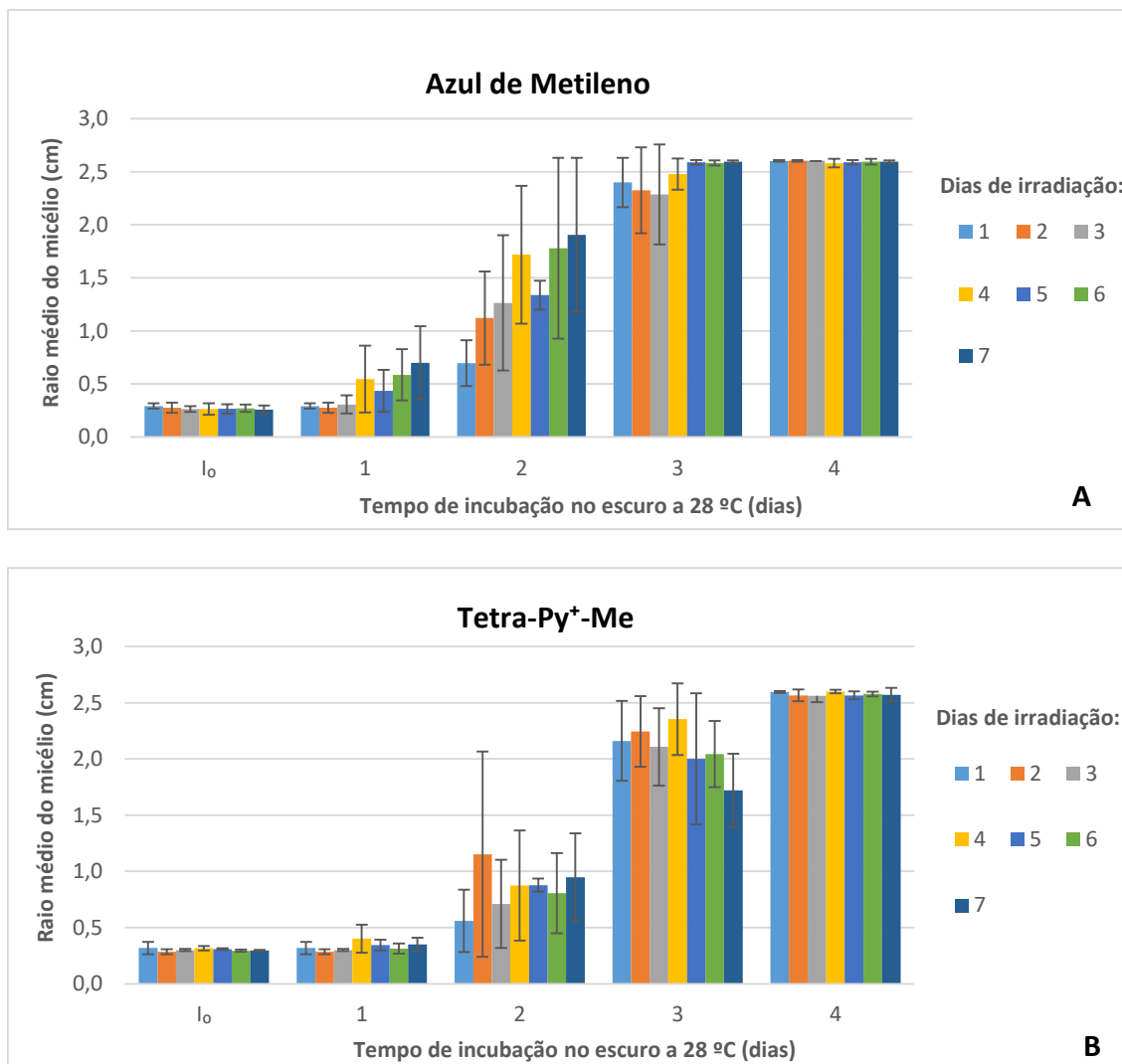


Figura 3.8 – Recuperação do crescimento do micélio de *Lasiodiplodia theobromae* após irradiação com luz PAR na presença dos PSs AM 1,0 mM (A) e Tetra-Py⁺-Me 50 µM (B). As diferentes cores representam os dias de exposição à luz PAR. O raio médio da colónia foi registado diariamente após incubação das amostras no escuro a 28 °C. I_0 representa o raio médio inicial do micélio. Os valores representados correspondem à média de 3 ensaios independentes, cada um com 5 réplicas, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. A significância estatística das diferenças entre as condições experimentais foi avaliada por *one-way* ANOVA.

3.4 – Produção de biomassa em meio líquido

A produção de biomassa em culturas líquidas de *L. theobromae* na presença dos PSs sintéticos AM e Tetra-Py⁺-Me, durante 7 dias de irradiação com luz PAR, encontra-se representada na figura 3.9. A irradiação das culturas na presença de AM ou Tetra-Py⁺-Me, causou a redução significativa na produção de biomassa ($p < 0,05$) relativamente ao CC. A

redução foi de 57% para AM e 54% para Tetra-Py⁺-Me. O aparente aumento na produção de biomassa no escuro, na presença de Tetra-Py⁺-Me, não foi estatisticamente significativo.

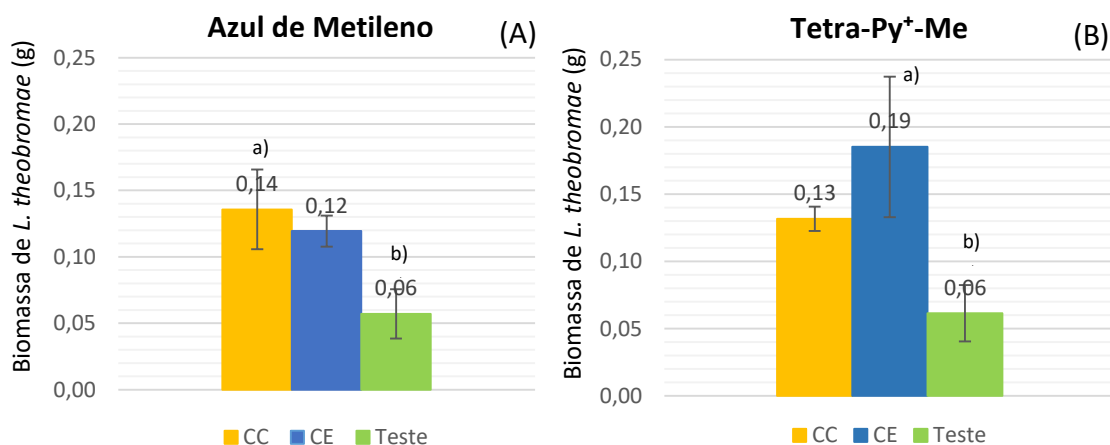


Figura 3.9 – Produção da biomassa de *Lasiodiplodia theobromae* durante 7 dias de exposição contínua a luz PAR. Os ensaios foram realizados em meio líquido de aveia na presença de 50 µM de AM (A) ou 5,0 µM de Tetra-Py⁺-Me (B). O CC corresponde à exposição do fungo à luz solar sem adição de PS e o Teste à adição do PS ao meio líquido. O CE contém a mesma concentração de PS que o teste mas foi protegido da luz. As colunas representam a média de 3 ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os grupos homogêneos definidos por ANOVA one-way ($p < 0,05$) e comparação *post-hoc* pelo R-W-G-W Q range test estão identificados como *a* e *b*, respetivamente.

3.5 – Tipo de mecanismo de inativação fotodinâmica

A contribuição relativa dos dois tipos de mecanismo de inativação fotodinâmica dos PSs sintéticos AM e Tetra-Py⁺-Me foi avaliada em experiências de adição de *scavengers* e os resultados estão representados na figura 3.10. A adição de azida sódica não teve efeito significativo na fotossensibilização com AM nem com a porfirina, sendo os valores de biomassa total semelhantes aos correspondentes à condição de teste com os PSs. A adição de D-manitol resultou num aumento significativo da biomassa produzida na presença de AM ($p < 0,05$), para um valor semelhante ao obtido no controlo claro (Fig. 3.9). Na presença da porfirina, a adição de D-manitol não induziu efeito significativo.

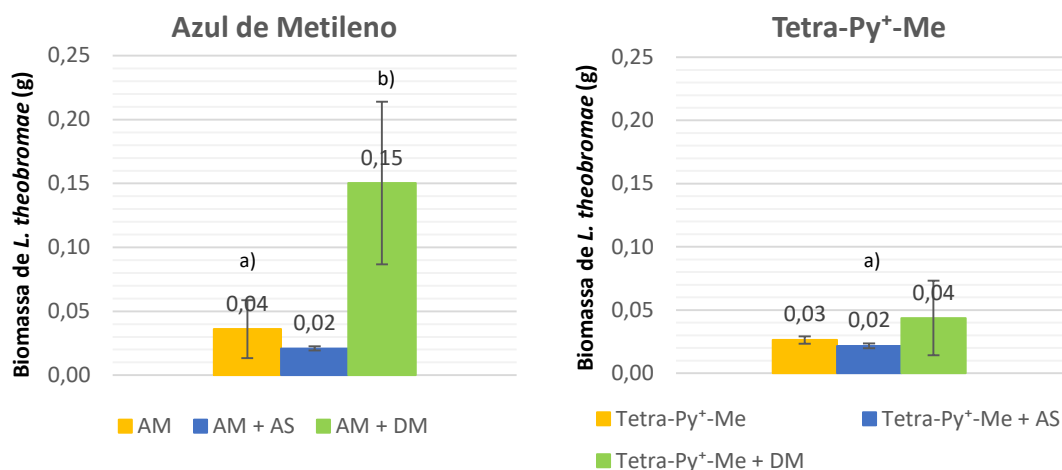


Figura 3.10 – Produção da biomassa de *Lasiodiplodia theobromae* durante 7 dias de exposição contínua a luz PAR, em meio líquido contendo os PSs AM (50 μ M) ou Tetra-Py⁺-Me (5,0 μ M) e os *scavengers* de NaN₃ (AS, 100 mM) e D-manitol (DM, 100 mM). Os valores correspondem à média de 5 réplicas e as barras de erro representam o desvio padrão. Os grupos homogêneos definidos por ANOVA one-way ($p < 0,05$) e comparação *post-hoc* pelo R-W-G-W Q range test estão identificados como *a* e *b*, respectivamente.

4. Discussão

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da inativação fotodinâmica no controle do crescimento do micélio de *L. theobromae*. Foram testados os fotossensibilizadores sintéticos TBO, AM, porfirina tetracatiónica Tetra-Py⁺-Me e derivados de clorinas e o fotossensibilizador natural riboflavina. Como fonte de luz usou-se inicialmente luz solar natural e posteriormente um sistema de lâmpadas emitindo na gama PAR (400-700 nm).

Começou-se por avaliar o efeito fotodinâmico à luz solar dos PSs TBO, AM e Riboflavina no crescimento do micélio ao aplicar duas formas de exposição do fungo ao PS, durante o seu cultivo: a aplicação direta da solução de PS sobre a superfície do meio sólido (espalhamento) ou a incorporação do PS em meio semi-sólido aplicada sobre o meio sólido de base (camada-dupla). As duas estratégias experimentais produziram efeitos diferentes. O método de espalhamento não permitiu demonstrar inibição significativa do crescimento fungo com nenhum dos PSs testados, após sete dias de exposição à luz solar aplicada segundo os ciclos naturais dia/noite. Apesar de se ter verificado atraso no crescimento do fungo, a diferença não é estatisticamente significativa e no final da experiência, as condições-teste registaram crescimento semelhante ao

dos controlos. Estes resultados mostram, assim, que na ausência de luz, as células ainda viáveis voltam a recuperar dos danos provocados pelos ROS produzidos durante o dia.

Os resultados do método da camada-dupla com 1 mM de TBO ou com 2,66 mM de riboflavina mostram um perfil de inativação semelhante ao observado com estes PSs nos testes de espalhamento. No final na experiência, não houve diferença significativa entre o tamanho do micélio nos testes e no controlo. No entanto, com 1,0 mM de AM aplicado pela técnica de camada-dupla, houve inibição do crescimento e a recuperação da inibição não foi completa. Assim, no final da experiência, o raio médio na condição teste era de cerca de 40 % do controlo. Verificou-se, assim, que a aplicação do PS sob a forma de camada gelificada superficial foi mais eficaz na inibição do crescimento do micélio. Este resultado pode estar relacionado com uma maior superfície de contacto entre as hifas e as moléculas de PS. As extremidades das hifas conseguem penetrar em materiais sólidos ou semi-sólidos para maximizar a obtenção de nutrientes constituindo a zona penetrativa do micélio, responsável pela absorção de nutrientes a subsequente abastecimento das hifas aéreas [96]. Aplicando o PS na camada semi-sólida, rica em nutrientes e facilmente penetrável pelas hifas em crescimento, pode ter aumentado a superfície de contacto e consequentemente a eficiência de ligação das moléculas de PS à parede das hifas. Em termos de aplicação prática, o uso de pastas, emulsões ou tintas contendo o PS (ex: tinta ou gel acrílico) diretamente nas feridas expostas nas videiras, após a prática da poda ou de outros ferimentos causados durante o processo, pode proporcionar melhor proteção do que a pulverização com soluções líquidas.

Dado que se obteve um maior efeito inibitório sobre *L. theobromae* quando PS foi adicionado à camada mais superficial de meio, utilizou-se esta abordagem para testar a duplicação da concentração de PS, com o objetivo de aumentar o efeito inibitório. No entanto, verificou-se que continuou a não haver inibição significativa, nem com 2 mM de TBO nem com 5,32 mM de riboflavina. A correlação entre a eficiência de inativação e a concentração de PS tem sido demonstrada com diversos PSs, incluindo o TBO [62][97]. Contudo, tem também sido observada uma redução da eficiência de inativação com concentrações muito elevadas, uma vez que os locais alvo do PS ficam saturados deixando uma quantidade substancial de PS não ligado que vai absorver os fotões de luz longe das células [98]. Como as ROS têm tempos de vida curtos que limitam o seu deslocamento, apenas as estruturas que estão na proximidade do PS iriam sofrer dano [99]. Embora seja um PS interessante para aplicação em matrizes alimentares uma vez que é um aditivo alimentar autorizado (E101), a riboflavina tem mostrado resultados decepcionantes na inativação fotodinâmica de fungos. No entanto, Heaselgrave et al. [100] tenham obtido a inativação total de esporos de *C. albicans* e *F. solani* usando um simulador

solar. A concentração testada no presente trabalho (5,32 mM) corresponde a 0,2% (m/v) o que fica dentro das gamas de concentração usadas em diversos ensaios de PDI de fungos com riboflavina. O tratamento com 0,1% de riboflavina e luz UV-A foi ineficaz na inibição do crescimento dos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium* sp. [101] e o aumento da concentração para 0.5 % não foi suficiente para inativar *C. albicans* [102]. A ausência de efeito inibitório associado à riboflavina pode ser explicada pela baixa foto-estabilidade deste PS natural [103]. Na presença de oxigénio, a riboflavina atua segundo um mecanismo do tipo II, exibindo uma produção de 1O_2 que poderia ser suficiente para causar efeitos citotóxicos letais [105-106]. No entanto, a molécula de riboflavina pode oxidar-se por ação do 1O_2 gerado [105] não satisfazendo assim um dos pré-requisitos importantes de um bom PS. A suscetibilidade à fotodegradação é provavelmente devido à instabilidade da cadeia de ribose [106-107]. Esta relativa rápida degradação na presença de luz limita o seu uso em aplicações práticas. Outra desvantagem deste PS é o facto de não ter carga positiva, o que diminui a eficiência de ligação à parede celular dos fungos, que tal como a das bactérias, apresenta carga negativa [108].

Na presença de 2 mM de AM, houve uma redução de cerca de 80% no crescimento do micélio *L. theobromae*. Experiências com este PS demonstraram a redução quase total da viabilidade dos conídios de *Colletotrichum abscissum*, por exposição à luz solar [84] bem como a inibição do crescimento de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *Aspergillus nidulans* [85]. No presente trabalho, a inibição com a concentração de 2 mM foi maior do que com 1 mM, demonstrando que a concentração de PS é, neste caso, um determinante importante de eficiência de inativação, tal como anteriormente documentado [62][109]. No entanto, como o AM tem atividade antibacteriana e antifúngica intrínseca mesmo na ausência de luz [110-111], o aumento da concentração é limitado pela possibilidade de aumento da toxicidade associada [62]. No presente estudo, a exposição de *L. theobromae* a AM no escuro não causou efeito inibitório o que é coerente com resultados obtidos em *C. albicans* [112], *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* [85], *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum* [93]. Uma vez que a ausência de citotoxicidade no escuro é um pré-requisito de um bom PS, associado à sua elevada inibição do micélio, o AM torna-se assim um bom candidato para a PDT de *L. theobromae*.

No sentido eliminar o efeito de recuperação no escuro, a PDI de *L. theobromae* foi ainda testada em condições de iluminação contínua artificial (luz PAR). Nestes ensaios incluiu-se também uma porfirina tetracatiónica (Tetra-Py⁺-Me) e 4 derivados de clorinas (ZnChl TPPF₁₆ [SPyM]₄, H₂Chl TPPF₁₆ [SPyM]₄, H₂Chl TPPF₁₆ [NPyOM]₄ e ZnChl TPPF₁₆ [NPyOM]₄). Com irradiação contínua conseguiu-se a inibição completa do crescimento do micélio na presença de

TBO, AM, porfirina e clorinas e ainda uma inibição de 90% do crescimento, com riboflavina, confirmando que, no caso das experiências com luz solar natural, a interrupção da irradiação durante a noite foi determinante na ineficácia quase geral da inativação. Apesar que a fluência de 40 W/m² obtida com o sistema de luz artificial seja inferior à da radiação solar natural, os resultados obtidos são consideravelmente melhores. Quando a irradiação cessa, a produção de ROS também termina e as células que possivelmente ainda estão viáveis podem recuperar dos danos e continuar a crescer. Com a exposição constante à luz PAR não existe a possibilidade de isto acontecer e, como tal, a eficiência da inativação fotodinâmica é melhorada significativamente. Contudo, verificou-se um efeito inibitório da luz artificial PAR que se traduziu numa redução de cerca de 20% do crescimento nos controlos claros. A luz visível pode afetar alguns processos fisiológicos em fungos filamentosos. Em espécies de *Aspergillus*, está documentado o efeito negativo da luz visível na região azul, sobre a formação do esclerócio [113]. Embora não esteja demonstrado um efeito do fotoperíodo sobre o crescimento de *L. theobromae*, a esporulação é afetada pelo tipo de luz [114-115]. Assim, deve ser considerada a hipótese de que a exposição à luz continua durante uma semana possa ter afetado outros processos fisiológicos relacionados com o crescimento das hifas.

Os valores de inibição registados nas experiências de irradiação contínua são semelhantes aos registados noutras experiências de PDI de fungos. Souza et al. [112] e Pelloi et al. [109] obtiveram uma inibição de 91,6% em *Candida krusei* e 95,14% em *C. albicans*, respetivamente, usando AM (0,31 mM e 70,4 µM) e luz laser (28 J/cm² e 6 J/cm²). Soares et al. [97] obteve também completa inibição do crescimento de *Cryptococcus gatti* com TBO (25 µM) e luz LED (54 J/cm²). Gonzales et al. [62] conseguiram uma inativação superior a 99% em conídios de *Metarhizium anisopliae* e *A. nidulans*, usando TBO (43 µM) e AM (41 µM) e irradiação com luz visível (50 W/m²). Usando um simulador solar (400 W/m²), Ouf et al. [116] conseguiram a inibição completa da germinação de esporos de *Trichophyton verrucosum*, *T. mentagrophytes* e *Microsporum canis* com AM (1 mM) e uma redução de 90% em *T. verrucosum*, 86,5% em *T. mentagrophytes* e 80,7% em *M. canis* com TBO (0,1 µM).

Nas experiências de irradiação contínua, houve inibição completa do crescimento do micélio com 50 µM de porfirina catiónica e de qualquer dos derivados de clorina (50 µM). As porfirinas catiónicas têm sido usadas com sucesso na PDI de vírus [60], bactérias gram-negativas e gram-positivas [61][117-118] e fungos do género *Botrytis* [119], *Candida* [120], *Colletotrichum* [121], *Penicillium* [122] e *Trichophyton* [123]. As cargas positivas presentes nas moléculas planares dos derivados de porfirinas estão relacionadas com o seu sucesso na PDI em fungos [123-124]. Além do número de cargas positivas, a eficácia da inativação de microrganismos por

derivados porfirínicos está também dependente de outras características estruturais da molécula do PS como a distribuição de carga e anfifilicidade [60][123-125], afetando as interações entre o PS e as estruturas alvo, como as paredes celulares, ácidos nucleicos, péptidos e lípidos [124][126-127]. As porfirinas catiónicas são, deste modo, PSs mais eficientes na inativação de microrganismos do que as aniónicas e neutras [124]. Resultados semelhantes têm sido reportados em ensaios de PDI de fungos, incluindo leveduras e conídios de bolores. A irradiação de *C. albicans* com luz visível na presença de Tetra-Py⁺-Me causou uma redução de 99,9% na concentração de células viáveis [127-128]. Em *Penicillium chrysogenum* foi conseguida uma inativação de cerca de 80% dos conídios com este PS e irradiação com luz branca [122]. A eficácia de Tetra-Py⁺-Me em concentrações relativamente baixas, associada à sua boa fotoestabilidade à luz e ausência de citotoxicidade no escuro, tornam este PS um bom candidato na inativação fotodinâmica de *L. theobromae*.

Mais recentemente, os derivados catiónicos de clorinas têm sido estudados como PS para a PDI de microrganismos. Conjugados de clorina e₆ com poly-L-lisina e polietilenoimina são eficientes na PDI de bactérias gram-positivas e gram-negativas e de fungos, uma vez que a estrutura molecular policatiónica aumenta a ligação e penetração nas membranas celulares [129-132]. Experiências de PDI com clorina e₆, com o seu derivado hidrogenado clorina e₆H [133] e com o conjugado pL-ce6 [130] resultaram na inibição total de *C. albicans*. O presente estudo avalia pela primeira vez a eficiência de 4 novas clorinas, sintetizadas no Departamento de Química da Universidade de Aveiro, na inativação fotodinâmica de um fungo fitopatogénico. No seu conjunto, as clorinas causaram uma forte inibição (>96%) do crescimento do fungo, havendo mesmo inibição total com as clorinas ZnChl TPPF₁₆ [SPyM]₄ e H₂Chl TPPF₁₆ [NPYOM]₄. A estrutura do PS é um dos fatores que determina a sua afinidade, seletividade e eficiência. Sabe-se que a posição das cargas afeta as interações electrostáticas com biomoléculas aniónicas e a lipofilicidade do PS. A carga positiva na posição *para* do anel piridílico tende a aumentar a afinidade do PS para as células, relativamente aos seus análogos nas posições *ortho* ou *meta* [134]. A quelação de estruturas-cores de compostos com Zn é conhecida por reduzir a hidrofiliabilidade e aumentar o rendimento de produção de ¹O₂ devido à absorção de um maior número de fótons provocada pela alteração da banda de absorção [135-136]. No entanto, a presença do elemento zinco na estrutura molecular das clorinas e a distribuição das cargas catiónicas na estrutura molecular não influenciou significativamente a sua eficácia na inibição de *L. theobromae* tendo todas causado inativação significativa do crescimento do fungo. Apesar da sua elevada eficiência na PDI e da ausência de citotoxicidade no escuro, a ausência de fotoestabilidade das clorinas foi observada após 24h de exposição à luz. Estudos adicionais serão

necessários para avaliar a sua eficiência em condições de exposição solar com períodos cíclicos naturais de escuridão e luz e para determinar se a ausência de estabilidade à luz é um fator determinante na sua eficiência.

Depois de se ter concluído pelas experiências com luz artificial contínua que havia inibição completa do crescimento do fungo durante os 7 dias da experiência, foram feitas experiências de recuperação para avaliar o tempo mínimo de exposição à luz solar necessário para obter a total inativação do fungo *L. theobromae* com AM e Tetra-Py⁺-Me. Para isto, ao longo do período de incubação de setes dias, foram removidos diariamente amostras e colocadas a incubar no escuro. No entanto, após a medição diária do raio das colônias, o que se verificou foi que o fungo conseguia sempre recuperar a sua viabilidade, retomando o crescimento. Concluiu-se, assim que a PDI causou uma inibição sub-letal do crescimento mas não a morte celular. Experiências com os fungos *Aspergillus nidulans* e *Metarhizium anisopliae* mostraram que os efeitos da fotossensibilização com AM reverteram após 72h de incubação no escuro [62]. No entanto, *C. albicans* tratada com Tetra-Py⁺-Me não recuperou a viabilidade celular durante a incubação no escuro [127]. A fluência total de 40 W/m² da luz PAR pode não ter gerado um elevado rendimento de ROS suficiente para provocar danos letais na hifas, normalmente mais resistentes à PDI do que as leveduras [137].

Para além da redução do crescimento, foi também avaliado o efeito da fotossensibilização com AM e com Tetra-Py⁺-Me e luz contínua, na produção de biomassa. A produção da biomassa foi menos afetada do que o crescimento radial do micélio. A redução relativamente ao controlo foi de 57% com AM e 54% com Tetra-Py⁺-Me. As experiências iniciais em que se compararam dois modos de aplicação do PS no meio sólido (espalhamento e camada dupla) revelaram que só havia efeito quando o PS estava incorporado no meio de cultura. Isto foi interpretado como indicação de que a nutrição, através das hifas penetrativas, tinha sido afetada e que crescimento do micélio estaria a ser limitado por falta de nutrientes. Comparativamente, nas culturas em meio líquido o efeito parece ter sido atenuado, uma vez que continuou a haver produção de biomassa. Esta diminuição da suscetibilidade pode ser explicada pelo acesso facilitado aos nutrientes, quando as hifas estão imersas no meio líquido, suportando assim a hipótese de a absorção de nutrientes através da membrana é uma das funções mais afetadas na PDI de fungos filamentosos.

A PDI de microrganismos pode envolver reações do Tipo I (radicais livres) ou Tipo II (oxigénio singleto), dependendo do tipo do PS e do meio em que a reação ocorre, e frequentemente ambos os processos ocorrem concomitantemente [138]. É o caso da PDI com

AM, em que é conhecida a formação de radicais (Tipo I) e de oxigénio singleto (Tipo II) [139]. No entanto, alguns estudos apontam para a preponderância do mecanismo do Tipo II na inativação de fungos com AM [140-142]. No presente trabalho, testaram-se *quencher*/*scavengers* de radicais e de oxigénio singleto para determinar o mecanismo preponderante na inativação de *L. theobromae* com AM e com a porfirina. A azida sódica é conhecida por ser um *quencher* físico de $^1\text{O}_2$ [143] e o D-manitol por ser um *scavenger* do anião radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e do radical hidroxilo ($^{\bullet}\text{OH}$) [128]. A adição de D-manitol mostrou ter um efeito protetor na inibição fotodinâmica causada por AM, traduzindo-se por um aumento da produção de biomassa de *L. theobromae*, relativamente ao controlo sujeito a PDI, o que sugere a preponderância do mecanismo do Tipo I. Uma possível explicação para esta diferença de resultados comparativamente com os dados existentes na literatura é o facto de que grandes concentrações de AM resultam na formação de dímeros que são menos eficientes na geração de $^1\text{O}_2$ e, como tal, a reação do Tipo II é alterada para o Tipo I [139]. Após excitação eletrónica dos dímeros, são observadas reações de transferência de eletrões formando radicais semi-reduzidos e semi-oxidados. Os radicais semi-reduzidos podem reagir com o oxigénio molecular formando o superóxido, que pode levar à formação de outra espécie reativas de oxigénio, incluindo o radical hidroxilo altamente reativo [139]. A alteração do mecanismo preponderante foi também observada na presença de um dador biológico de eletrões, como o NADH celular, em que a foto-excitação de AM levou a reações do Tipo I, com a formação eficiente do anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e, presumivelmente, peróxido de hidrogénio (H_2O_2) [144].

Na determinação do mecanismo envolvido na inativação do fungo *L. theobromae* por Tetra-Py⁺-Me, nem o *quencher* azida sódica nem o *scavenger* D-manitol tiveram efeito protetor. Contudo, a porfirina Tetra-Py⁺-Me é conhecida por produzir elevadas quantidades de $^1\text{O}_2$, sendo normalmente aceite que atua por mecanismo do Tipo II [122-123][128][145]. Apesar de o ião azida ser um *quencher* de $^1\text{O}_2$, este também pode desativar compostos no seu estado excitado de tripleto, prevenindo, assim, os mecanismos do Tipo I e Tipo II [146]. Além disso, em concentrações elevadas a azida sódica é tóxica, afetando a respiração e a atividade enzimática o que pode ter potenciado a inibição do crescimento do fungo [138][147]. A produção de $^1\text{O}_2$ também pode ser modificada dependendo de onde o PS está localizado (estruturas celulares com mais ou menos O_2) e diminuindo quando o PS forma agregados, o que associado com um aumento da citotoxicidade produzida pela própria azida sódica, pode explicar os resultados obtidos. Novas concentrações podem ser testadas no futuro de modo a obter resultados mais esclarecedores e determinar, assim, o mecanismo de inativação envolvido na inativação do fungo *L. theobromae* com maior certeza.

5. Conclusão

Este estudo mostrou que a inativação fotodinâmica é uma abordagem possível como estratégia de controlo do fungo fitopatogénico *L. theobromae*, com máximo potencial quando os PSs são incorporados numa camada mais superficial de meio semi-sólido e quando expostos a luz contínua. A aplicação direta de pastas, emulsões ou tintas contendo um PS nas feridas provocadas durante o processo da poda ou outros, constitui uma abordagem com maior probabilidade de ser eficiente do que a pulverização com soluções líquidas. No entanto, é um trabalho mais laborioso para maiores áreas de produção, acarretando maior despesa económica para os viticultores. O recrescimento do fungo observado quando foram aplicados fotoperíodos naturais constitui um dos principais obstáculos desta estratégia de inativação e na sua aplicabilidade nas vinhas, dado a sua recuperação durante a noite. Os antifúngicos convencionais continuam, assim, a serem necessários para complementar esta abordagem, uma vez que têm um período mais longo de proteção em comparação com a ação dos PSs. No entanto, resultados promissores foram obtidos para o PS AM quando exposto à luz solar, mostrando o seu potencial como agente de controlo de *L. theobromae*. Estudos adicionais terão que ser realizados com a porfirina e clorinas usadas neste trabalho para determinar a sua eficiência à luz solar e, por último, estudos em larga escala no campo. À medida que novos PSs vão sendo sintetizados, com características estruturais que lhes permitam ter uma maior eficiência na inibição de microrganismos, a inativação fotodinâmica caminha para um futuro promissor no combate a agentes fitopatogénicos.

Referências

- [1] J. Cunha, M. Teixeira-santos, J. Brazão, P. Fevereiro, and J. E. Eiras-dias, "Portuguese *Vitis vinifera* L. Germplasm: Accessing Its Diversity and Strategies for Conservation," *Mediterr. Genet. Code - Grapevine Olive. InTech*, vol. 6, pp. 125–145, 2013.
- [2] H. Fraga, I. García de Cortázar Atauri, A. C. Malheiro, J. Moutinho-Pereira, and J. A. Santos, "Viticulture in Portugal: A review of recent trends and climate change projections," *OENO One*, vol. 51, no. 2, p. 61, 2017.

- [3] J. M. Aurand, "State of the Vitiviniculture World Market," *38th OIV World Congr. vine wine*, no. April, pp. 1–14, 2017.
- [4] INE (Instituto Nacional de Estadística), *Estatísticas Agrícolas 2016*. 2017.
- [5] S. Furuya *et al.*, "Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases," *Biocontrol Sci. Technol.*, vol. 21, no. 6, pp. 705–720, 2011.
- [6] J. R. Úrbez-Torres, P. Adams, J. Kamas, and W. D. Gubler, "Identification, incidence, and pathogenicity of fungal species associated with grapevine dieback in Texas," *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 60, no. 4, pp. 497–507, 2009.
- [7] J. M. Van Niekerk, P. W. Crous, P. H. Fourie, and F. Halleen, "DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines," *Mycol. Soc. Am.*, vol. 96, no. 4, pp. 781–798, 2004.
- [8] A. Taylor, G. E. S. J. Hardy, P. Wood, and T. Burgess, "Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia," *Australas. Plant Pathol.*, vol. 34, pp. 187–195, 2005.
- [9] J. R. Úrbez-Torres, G. M. Leavitt, T. M. Voegel, and W. D. Gubler, "Identification and Distribution of *Botryosphaeria* spp. Associated with Grapevine Cankers in California," *Plant Dis.*, vol. 90, no. 12, pp. 1490–1503, 2006.
- [10] J. Baskarathevan, M. V Jaspers, E. E. Jones, and H. J. Ridgway, "Incidence and distribution of botryosphaeriaceous species in New Zealand vineyards," *Eur J Plant Pathol*, vol. 132, pp. 549–560, 2012.
- [11] J. M. Van Niekerk, W. Bester, F. Halleen, P. W. Crous, and P. H. Fourie, "The distribution and symptomatology of grapevine trunk disease pathogens are influenced by climate," *Phytopathol. Mediterr.*, vol. 50, pp. 98–111, 2011.
- [12] J. R. Urbez-torres *et al.*, "Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri," *Fungal Divers.*, vol. 52, pp. 169–189, 2012.
- [13] A. J. L. Phillips, "*Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal," *Phytopathol. Mediterr.*, vol. 41, no. 1, pp. 3–18, 2002.
- [14] J. R. Úrbez-torres, E. Bruez, J. Hurtado, and W. D. Gubler, "Effect of Temperature on Conidial Germination of Botryosphaeriaceae Species Infecting Grapevines," *Plant Dis.*, vol. 94, no. 12, pp. 1476–1484, 2010.

- [15] J. R. Úrbez-Torres, G. M. Leavitt, J. C. Guerrero, J. Guevara, and W. D. Gubler, "Identification and Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata* , the Causal Agents of Bot Canker Disease of Grapevines in Mexico," *Plant Dis.*, vol. 92, no. 4, pp. 519–529, 2008.
- [16] A. H. Al-saadoon, M. K. M. Ameen, M. A. Hameed, A. Al-Badran, and Z. Ali, "First report of grapevine dieback caused by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neoscytalidium dimidiatum* in Basrah , Southern Iraq," *African J. Biotechnol.*, vol. 11, no. 95, pp. 16165–16171, 2012.
- [17] J. Yan *et al.*, "Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China," *Fungal Divers.*, pp. 1–9, 2013.
- [18] K. C. Correia, M. A. Silva, M. A. D. M. Jr, J. Armengol, and A. J. L. Phillips, "Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region," *Plant Pathol.*, vol. 65, pp. 92–103, 2016.
- [19] E. Rodríguez-Gálvez, E. Maldonado, and A. Alves, "Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru," *Eur J Plant Pathol*, 2014.
- [20] G. M. J. Leavitt, "The occurrence, distribution, effects and control of *Botryodiplodia theobromae* on *Vitis vinifera* in California, Arizona and northern Mexico.," 1991.
- [21] W. M. Pitt, R. Huang, C. C. Steel, and S. Savocchia, "Pathogenicity and epidemiology of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevines in Australia," *Australas. Plant Pathol. Soc.*, 2013.
- [22] A. Alves, P. W. Crous, A. Correia, and A. J. L. Phillips, "Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*," *Fungal Divers.*, vol. 28, pp. 1–13, 2008.
- [23] S. Burruano, V. Mondello, G. Conigliaro, and A. Alfonzo, "Grapevine decline in Italy caused by *Lasiodiplodia theobromae*," *Phytopathol. Mediterr.*, vol. 47, pp. 132–136, 2008.
- [24] A. Aroca, R. Raposo, D. Gramaje, J. Armengol, S. Martos, and J. Luque, "First report of *Lasiodiplodia theobromae* associated with decline of grapevine rootstock mother plants in Spain," *Plant Dis.*, vol. 92, no. 5, p. 832, 2008.
- [25] E. Abreo, S. Martinez, L. Bettucci, and S. Lupo, "Characterization of Botryosphaeriaceae

- species associated with grapevines in Uruguay," *Australas. Plant Pathol.*, vol. 42, pp. 241–249, 2013.
- [26] D. S. Akgul, N. G. Savas, and A. Eskalen, "First Report of Wood Canker Caused by *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, and *Lasiodiplodia theobromae* on Grapevine in Turkey," *Plant Dis.*, vol. 98, no. 4, p. 568, 2014.
- [27] S. Mohali, T. I. Burgess, and M. J. Wingfield, "Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers," *For. Path.*, vol. 35, pp. 385–396, 2005.
- [28] Y. Qiu, C. C. Steel, G. J. Ash, and S. Savocchia, "Survey of Botryosphaeriaceae associated with grapevine decline in the Hunter Valley and Mudgee grape growing regions of New South Wales," *Australas. Plant Pathol. Soc.*, vol. 40, pp. 1–11, 2011.
- [29] W. M. Pitt, R. Huang, C. C. Steel, and S. Savocchia, "Identification, distribution and current taxonomy of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia," *Aust. J. Grape Wine Res.*, vol. 16, no. 1998, pp. 258–271, 2010.
- [30] C. Félix *et al.*, "Temperature Modulates the Secretome of the Phytopathogenic Fungus *Lasiodiplodia theobromae*," *Front. Plant Sci.*, vol. 7, no. August, pp. 1–12, 2016.
- [31] C. Félix *et al.*, "Production of toxic metabolites by two strains of *Lasiodiplodia theobromae*, isolated from a coconut tree and a human patient," *Mycologia*, vol. 0, no. 0, pp. 1–12, 2018.
- [32] B. Slippers and M. J. Wingfield, "Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact," *Fungal Biol. Rev.*, vol. 21, no. 2–3, pp. 90–106, 2007.
- [33] L. Epstein, S. Kaur, and J. S. VanderGheynst, "Botryosphaeria-related dieback and control investigated in noncoastal California grapevines," *Calif. Agric.*, vol. 62, no. 4, pp. 161–166, 2008.
- [34] S. Serra, M. A. Mannoni, and V. Ligios, "Studies on the susceptibility of pruning wounds to infection by fungi involved in grapevine wood diseases in Italy," *Phytopathol. Mediterr.*, vol. 47, pp. 234–246, 2008.
- [35] P. Kuntzmann, S. Villaume, and C. Bertsch, "Conidia dispersal of *Diplodia* species in a French vineyard," *Phytopathol. Mediterr.*, vol. 48, pp. 150–154, 2009.

- [36] J. R. Úrbez-Torres and W. D. Gubler, "Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*," *Plant Pathol.*, vol. 60, pp. 261–270, 2011.
- [37] J. M. Van Niekerk, F. J. Calitz, F. Halleen, and P. H. Fourie, "Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa," *Eur J Plant Pathol*, vol. 127, pp. 375–390, 2010.
- [38] S. Martos, A. Andolfi, J. Luque, L. Mugnai, G. Surico, and A. Evidente, "Production of phytotoxic metabolites by five species of Botryosphaeriaceae causing decline on grapevines , with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N . parvum*," *Eur. J. plant Pathol.*, vol. 121, pp. 451–461, 2008.
- [39] V. Mussi-Dias, A. V. dos Santos, and M. das G. M. Freire, "Pycnidia and conidia quantification of *Lasiodiplodia* using a culture medium enriched with sugarcane bagasse," *J. Agric. Res.*, vol. 2, no. September, 2016.
- [40] P. Venkatasubbaiah and W. S. Chilton, "Phytotoxins of *Botryosphaeria obtusa*," *J. Nat. Prod.*, vol. 53, no. 6, pp. 1628–1630, 1990.
- [41] M. de L. C. da Silva *et al.*, "Purification and structural characterisation of (1→3; 1→6)- β -d-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study," *Carbohydr. Polym.*, vol. 61, no. 1, pp. 10–17, 2005.
- [42] G. A. Díaz and B. A. Latorre, "Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile," *Crop Prot.*, vol. 46, pp. 106–112, 2013.
- [43] W. M. Pitt, M. R. Sosnowski, R. Huang, Y. Qiu, C. C. Steel, and S. Savocchia, "Evaluation of Fungicides for the Management of Botryosphaeria Canker of Grapevines," no. September, pp. 1303–1308, 2012.
- [44] W. Bester, P. W. Crous, and P. H. Fourie, "Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species," *Australas. Plant Pathol.*, vol. 36, no. 2001, pp. 73–77, 2007.
- [45] P. E. Rolshausen, J. R. Úrbez-torres, S. Rooney-latham, A. Eskalen, R. J. Smith, and W. D. Gubler, "Evaluation of Pruning Wound Susceptibility and Protection Against Fungi Associated with Grapevine Trunk Diseases," vol. 61, no. January, p. 1, 2010.

- [46] A. V. da S. Pereira, R. B. Martins, S. J. Michereff, M. B. da Silva, and M. P. S. Câmara, "Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides," *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 132, no. April, pp. 489–498, 2012.
- [47] S. Compant, G. Brader, S. Muzammil, A. Sessitsch, A. Lebrühi, and F. Mathieu, "Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases," vol. 2009, no. Faostat 2011, 2012.
- [48] G. Kexiang, L. Xiaoguang, L. Yonghong, Z. Tianbo, and W. Shuliang, "Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* to Control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*, the Cause of Apple Ring Rot," *J. Phytopathol.*, vol. 150, pp. 271–276, 2002.
- [49] A. J. Dik, G. Koning, and J. Kohl, "Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato," *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 105, pp. 115–122, 1999.
- [50] A. Alfonzo, G. Conigliaro, L. Torta, S. Burruano, and G. Moschetti, "Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens," *Phytopathol. Mediterr.*, vol. 48, pp. 155–158, 2009.
- [51] G. Berg, "Plant – microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 84, pp. 11–18, 2009.
- [52] S. Compant, B. Duffy, J. Nowak, C. Clément, and Essaid Ait Barka, "Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles , Mechanisms of Action , and Future Prospects," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 9, pp. 4951–4959, 2005.
- [53] J. Che, B. Liu, C. Ruan, J. Tang, and D. Huang, "Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes black spot disease of harvested wax apple fruit , using a strain of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX," *Crop Prot.*, vol. 67, pp. 178–183, 2015.
- [54] A. Baloch *et al.*, "IN -VITRO EVALUATION OF DIFFERENT FUNGICIDES AND THE BIO-CONTROL AGENT *TRICHODERMA HARZIANUM* AGAINST *BOTRYODIPLODIA THEOBROMAE*, THE CAUSE OF GUAVA DECLINE," vol. 14, no. 3, pp. 491–496, 2017.
- [55] O. Rabb, "Über die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusoren," *Z. Biol.*, vol. 39, pp. 524–526, 1900.
- [56] H. Von Tappeiner and A. Jesionek, "Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen.," *Munch Med Wochenschr.*, vol. 1, pp. 2042–2044, 1903.

- [57] H. Abrahamse and M. R. Hamblin, "New photosensitizers for photodynamic therapy," *Biochem. J.*, vol. 473, pp. 347–364, 2016.
- [58] L. M. Baltazar, A. Ray, D. A. Santos, P. S. Cisalpino, A. J. Friedman, and J. D. Nosanchuk, "Antimicrobial photodynamic therapy : an effective alternative approach to control fungal infections," *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. March, pp. 1–11, 2015.
- [59] H. D. De Menezes *et al.*, "Furocoumarins and coumarins photoinactivate *Colletotrichum acutatum* and *Aspergillus nidulans* fungi under solar radiation," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 131, pp. 74–83, 2014.
- [60] L. Costa *et al.*, "Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: a study of charge effect," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 7, pp. 415–422, 2008.
- [61] M. A. Pereira *et al.*, "Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 13, pp. 680–690, 2014.
- [62] F. P. Gonzales, S. H. da Silva, D. W. Roberts, and G. U. L. Braga, "Photodynamic Inactivation of Conidia of the Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with Methylene Blue and Toluidine Blue," *Photochem. Photobiol.*, vol. 86, no. December 2017, pp. 653–661, 2010.
- [63] B. M. Soares *et al.*, "In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp . growth and adhesion to buccal epithelial cells," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 94, no. 1, pp. 65–70, 2009.
- [64] M. R. Hamblin, "Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 33, p. 67–73 This, 2016.
- [65] A. Oniszczyk, K. A. Wojtunik-kulesza, T. Oniszczyk, and K. Kasprzak, "The potential of photodynamic therapy (PDT) — Experimental investigations and clinical use," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 83, pp. 912–929, 2016.
- [66] G. Maria, F. Calixto, J. Bernegossi, L. M. De Freitas, C. R. Fontana, and M. Chorilli, "Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review," *Molecules*, vol. 21, pp. 1–18, 2016.
- [67] R. F. Donnelly, P. A. McCarron, and M. M. Tunney, "Antifungal photodynamic therapy," *Microbiol. Res.*, vol. 163, pp. 1–12, 2008.

- [68] T. Maisch *et al.*, "Fast and Effective Photodynamic Inactivation of Multiresistant Bacteria by Cationic Riboflavin Derivatives," *PLoS One*, 2014.
- [69] Kessel, Gomer, Morstyn, and Kaye, "Preclinical Examination of First and Second Generation Photosensitizers Used in Photodynamic Therapy," *Photochem. Photobiol.*, vol. 54, no. 6, pp. 1093–1107, 1991.
- [70] M. A. Vallés, "HpD and second generation photosensitizers for the photodynamic therapy of cancer," *Afinidad L.*, vol. 448, no. January, pp. 469–479, 1993.
- [71] J. Kou, D. Dou, and L. Yang, "Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications," *Oncotarget*, vol. 8, no. 46, pp. 81591–81603, 2017.
- [72] J. Zhang, C. Jiang, J. P. F. Longo, R. B. Azevedo, Z. Hua, and L. A. Muehlmann, "An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy," *Acta Pharm. Sin. B*, no. 9, pp. 1–10, 2017.
- [73] M. Babincová, P. Sourivong, and P. Babinec, "Gene transfer-mediated intracellular photodynamic therapy," *Med. Hypotheses*, vol. 54, pp. 180–181, 2000.
- [74] C. Staneloudi *et al.*, "Development and characterization of novel photosensitizer: scFv conjugates for use in photodynamic therapy of cancer," *Immunology*, vol. 120, pp. 512–517, 2007.
- [75] H. M. Lee *et al.*, "Ursodeoxycholic acid-conjugated chitosan for photodynamic treatment of HuCC-T1 human cholangiocarcinoma cells," *Int. J. Pharm.*, vol. 454, no. 1, pp. 74–81, 2013.
- [76] R. Weijer *et al.*, "Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: Combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery," *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, vol. 23, pp. 103–131, 2015.
- [77] M. Paardekooper, A. E. Van Gompel, J. Van Steveninck, and P. J. A. Van Den Broek, "The effect of photodynamic treatment of yeast with the sensitizer chloroaluminum phthalocyanine on various cellular parameters," *Photochem. Photobiol.*, vol. 62, no. 3, pp. 561–567, 1995.
- [78] K. O'Riordan, O. E. Akilov, and T. Hasan, "The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 2, p. 247–262 REVIEW, 2005.

- [79] J. P. F. Tijssen, H. W. Beekes, and J. Van Steveninck, "Localization of polyphosphates at the outside of the yeast cell plasma membrane," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 649, pp. 529–532, 1981.
- [80] M. Wainwright, "Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 42, pp. 13–28, 1998.
- [81] N. A. R. Gow, J. Latge, and C. A. Munro, "The Fungal Cell Wall: Structure , Biosynthesis , and Function," *Microbiol. Spectr.*, no. May, pp. 1–25, 2017.
- [82] M. Broekgaarden, R. Weijer, T. M. Van Gulik, M. R. Hamblin, and M. Heger, "Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies," *Springer*, 2015.
- [83] G. Bertoloni, E. Reddi, M. Gatta, C. Burlini, and G. Jori, "Factors Influencing the Haematoporphyrin-sensitized Photoinactivation of *Candida albicans*," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 135, pp. 957–966, 1989.
- [84] J. C. Gonzales *et al.*, "Photodynamic inactivation of conidia of the fungus *Colletotrichum abscissum* on *Citrus sinensis* plants with methylene blue under solar radiation," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 2017.
- [85] H. D. de Menezes *et al.*, "In Vitro Photodynamic Inactivation of Plant-Pathogenic Fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with Novel Phenothiazinium Photosensitizers," vol. 80, no. 5, pp. 1623–1632, 2014.
- [86] L. Huang, T. Dai, and M. R. Hamblin, "Antimicrobial Photodynamic Inactivation and Photodynamic Therapy for Infections," *Photodyn. Ther. Methods Mol. Biol.*, pp. 155–173, 2010.
- [87] F. Dicosmo, G. H. N. Towers, and J. Lam, "Photo-induced Fungicidal Activity Elicited by Naturally Occurring Thiophene Derivatives," *Pestic. Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 589–594, 1982.
- [88] J. S. Friedberg *et al.*, "In vitro effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 48, pp. 105–107, 2001.
- [89] V. Ambrosini, M. Issawi, V. Sol, and C. Riou, "Antimicrobial photodynamic treatment against plant pathogens : the power of anionic porphyrin against the grey mold agent (*Botrytis cinerea*)," no. September, pp. 1–2, 2018.
- [90] G. B. Rodrigues, M. Dias-baruffi, N. Holman, M. Wainwright, and G. U. L. Braga, "In vitro

- photodynamic inactivation of *Candida* species and mouse fibroblasts with phenothiazinium photosensitisers and red light," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 10, no. 2, pp. 141–149, 2013.
- [91] G. B. Rodrigues, F. L. Primo, A. C. Tedesco, and G. U. L. Braga, "In Vitro Photodynamic Inactivation of *Cryptococcus neoformans* Melanized Cells with Chloroaluminum Phthalocyanine Nanoemulsion," *Photochem. Photobiol.*, vol. 88, pp. 440–447, 2012.
- [92] H. D. de Menezes, L. Tonani, L. Bachmann, M. Wainwright, G. úbida L. Braga, and M. R. von Z. Kress, "Photodynamic treatment with phenothiazinium photosensitizers kills both ungerminated and germinated microconidia of the pathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium solani*," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 164, pp. 1–12, 2016.
- [93] G. B. Rodrigues, L. K. S. Ferreira, M. Wainwright, and G. U. L. Braga, "Susceptibilities of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 116, pp. 89–94, 2012.
- [94] P. H. Ruane, R. Edrich, D. Gampp, S. D. Keil, R. L. Leonard, and R. P. Goodrich, "Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light," vol. 44, no. June, pp. 877–885, 2004.
- [95] D. Martins *et al.*, "Photoinactivation of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit plants by cationic porphyrins," *Planta*, no. 123456789, 2018.
- [96] W. Balmant, M. H. Sugai-guérios, J. H. Coradin, N. Krieger, A. F. Junior, and D. A. Mitchell, "A Model for Growth of a Single Fungal Hypha Based on Well-Mixed Tanks in Series: Simulation of Nutrient and Vesicle Transport in Aerial Reproductive Hyphae," *PLoS One*, no. 3, pp. 1–22, 2015.
- [97] B. M. Soares *et al.*, "*Cryptococcus gattii*: In Vitro Susceptibility to Photodynamic Inactivation," *Photochem. Photobiol.*, vol. 87, pp. 357–364, 2011.
- [98] Z. Jackson, S. Meghji, A. MacRobert, B. Henderson, and M. Wilson, "Killing of the Yeast and Hyphal Forms of *Candida albicans* Using a Light-Activated Antimicrobial Agent," *Lasers Med. Sci.*, vol. 14, pp. 150–157, 1999.
- [99] T. Ito, "Toluidine blue: the mode of photodynamic action," *Photochem. Photobiol.*, vol.

25, pp. 47–53, 1977.

- [100] W. Heaselgrave and S. Kilvington, “Antimicrobial Activity of Simulated Solar Disinfection against Bacterial, Fungal, and Protozoan Pathogens and Its Enhancement by Riboflavin,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 17, pp. 6010–6012, 2010.
- [101] R. T. Kashiwabuchi, F. R. S. Carvalho, Y. A. Khan, F. Hirai, M. S. Campos, and P. J. McDonnell, “Assessment of fungal viability after long-wave ultraviolet light irradiation combined with riboflavin administration,” *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, vol. 251, pp. 521–527, 2013.
- [102] S. A. R. Martins *et al.*, “Antimicrobial Efficacy of Riboflavin/UVA Combination (365 nm) In Vitro for Bacterial and Fungal Isolates: A Potential New Treatment for Infectious Keratitis,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 49, no. 9, pp. 3402–3408, 2008.
- [103] M. A. Sheraz, S. H. Kazi, S. Ahmed, Z. Anwar, and I. Ahmad, “Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin,” *Beilstein J. Org. Chem.*, vol. 10, no. 8, pp. 1999–2012, 2014.
- [104] J. Baier, T. Maisch, M. Maier, E. Engel, M. Landthaler, and W. Baumler, “Singlet Oxygen Generation by UVA Light Exposure of Endogenous Photosensitizers,” *Biophys. J.*, vol. 91, no. August, pp. 1452–1459, 2006.
- [105] D. R. Cardoso, S. H. Libardi, and L. H. Skibsted, “Riboflavin as a photosensitizer . Effects on human health and food quality,” *Food Funct.*, vol. 3, pp. 487–502, 2012.
- [106] P. F. Heelis, “The Photophysical and Photochemical Properties of Flavins,” pp. 15–39, 1980.
- [107] C. K. Remucal and K. McNeill, “Photosensitized Amino Acid Degradation in the Presence of Riboflavin and Its Derivatives,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, pp. 5230–5237, 2011.
- [108] P. N. Lipke and R. Ovalle, “Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges,” *J. Bacteriol.*, vol. 180, no. 15, pp. 3735–3740, 1998.
- [109] L. S. Peloi, R. R. S. Soares, C. E. G. Biondo, V. R. Souza, N. Hioka, and E. Kimura, “Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue,” *J. Biosci.*, vol. 33, no. June, pp. 231–237, 2008.
- [110] P. G. Calzavara-Pinton, M. Venturini, and R. Sala, “A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 78, pp. 1–6, 2005.

- [111] M. Wainwright and K. B. Crossley, "Methylene Blue - a Therapeutic Dye for All Seasons ? Methylene," *J. Chemother.*, vol. 14, pp. 431–443, 2002.
- [112] S. C. de Souza, J. C. Junqueira, I. Balducci, C. Y. Koga-Ito, E. Munin, and A. O. C. Jorge, "Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 83, pp. 34–38, 2006.
- [113] J. W. Bennett, F. A. Fernholz, and L. S. Lee, "Effect of Light on Aflatoxins, Anthraquinones, and Sclerotia in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*," *Mycologia*, vol. 70, no. 1, pp. 104–116, 1978.
- [114] M. A. Khanzada, A. Q. Rajput, and S. Shahzad, "Effect of medium, temperature, light and inorganic fertilizers on in vitro growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* isolated from mango," *Pakistan Journal of Botany*, vol. v. 38. pp. 885–889, 2006.
- [115] A. Saha, P. Mandal, S. Dasgupta, and D. Saha, "Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl," *J. Environ. Biol.*, vol. 29, no. May, pp. 407–410, 2008.
- [116] S. A. Ouf, M. H. Abdel-Kader, H. A. Shokeir, and A. A. El-Adly, *Study of Solar Photosensitization Processes on Dermatophytic Fungi*. 2003.
- [117] E. Alves *et al.*, "Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* by cationic porphyrins under artificial and solar irradiation," *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 35, pp. 1447–1454, 2008.
- [118] A. Tavares *et al.*, "Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment," *Mar. Drugs*, vol. 8, pp. 91–105, 2010.
- [119] K. Imada, S. Tanaka, Y. Ibaraki, K. Yoshimura, and S. Ito, "Antifungal effect of 405-nm light on *Botrytis cinerea*," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 59, pp. 670–676, 2014.
- [120] S. A. G. Lambrechts, M. C. G. Aalders, and J. Van Marle, "Mechanistic Study of the Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* by a Cationic Porphyrin," vol. 49, no. 5, pp. 2026–2034, 2005.
- [121] C. C. Vandresen *et al.*, "In vitro photodynamic inactivation of conidia of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum graminicola* with cationic porphyrins," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 15, pp. 673–681, 2016.

- [122] M. C. Gomes *et al.*, "Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 10, pp. 1735–1743, 2011.
- [123] T. G. M. Smijs, R. N. S. Van Der Haas, J. Lugtenburg, Y. Liu, R. L. P. De Jong, and H. J. Schuitmaker, "Photodynamic Treatment of the Dermatophyte," *Photochem. Photobiol.*, vol. 80, pp. 197–202, 2004.
- [124] A. Oliveira *et al.*, "Porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of *Bacillus cereus* endospores," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 106, pp. 1986–1995, 2009.
- [125] M. R. Hamblin and T. Hasan, "Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 3, pp. 436–450, 2004.
- [126] D. Lazzeri, M. Rovera, L. Pascual, and E. N. Durantini, "Photodynamic Studies and Photoinactivation of *Escherichia coli* Using meso - Substituted Cationic Porphyrin Derivatives with Asymmetric Charge Distribution," *Photochem. Photobiol.*, vol. 80, no. 2, pp. 286–293, 2004.
- [127] M. P. Cormick, M. G. Alvarez, M. Rovera, and E. N. Durantini, "Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 44, no. 4, pp. 1592–1599, 2009.
- [128] M. P. Cormick, E. D. Quiroga, S. G. Bertolotti, M. G. Alvarez, and E. N. Durantini, "Mechanistic insight of the photodynamic effect induced by tri- and tetra-cationic porphyrins on *Candida albicans* cells," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 10, pp. 1556–1561, 2011.
- [129] N. S. Soukos, L. A. Ximenez-fyvie, M. R. Hamblin, S. S. Socransky, and T. Hasan, "Targeted Antimicrobial Photochemotherapy," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 42, no. 10, pp. 2595–2601, 1998.
- [130] T. N. Demidova and M. R. Hamblin, "Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, no. 6, pp. 2329–2335, 2005.
- [131] E. O. Omarova *et al.*, "Carboranyl-Chlorin e6 as a Potent Antimicrobial Photosensitizer," *PLoS One*, vol. 4, pp. 1–16, 2015.
- [132] L. Huang *et al.*, "Stable Synthetic Cationic Bacteriochlorins as Selective Antimicrobial Photosensitizers," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 9, pp. 3834–3841, 2010.

- [133] M. P. Uliana *et al.*, "Photobiological characteristics of chlorophyll a derivatives as microbial PDT agents," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 6, 2014.
- [134] R. Ezzeddine, A. Al-Banaw, A. Tovmasyan, J. D. Craik, I. Batinic-Haberle, and L. T. Benov, "Effect of Molecular Characteristics on Cellular Uptake, Subcellular Localization, and Phototoxicity of Zn (II) N-Alkylpyridylporphyrins," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 51, pp. 36579–36588, 2013.
- [135] A. V. Teles *et al.*, "Photodynamic inactivation of Bovine herpesvirus type 1 (BoHV- 1) by porphyrins," *J. Gen. Virol.*, vol. 1, no. August, 2018.
- [136] T. A. Skwor, S. Klemm, H. Zhang, B. Schardt, S. Blaszczyk, and M. A. Bork, "Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: A metalloporphyrin comparison," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 165, pp. 51–57, 2016.
- [137] E. Alves, M. A. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. Cunha, H. Nadais, and A. Almeida, "Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope," *Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, pp. 1–62, 2014.
- [138] L. Huang, Y. Xuan, Y. Koide, T. Zhiyentayev, M. Tanaka, and M. R. Hamblin, "Type I and Type II Mechanisms of Antimicrobial Photodynamic Therapy: An In Vitro Study on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria," *Lasers Surg. Med.*, vol. 499, no. May, pp. 490–499, 2012.
- [139] J. P. Tardivo *et al.*, "Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 2, pp. 175–191, 2005.
- [140] P. Calzavara-Pinton, M. T. Rossi, R. Sala, and M. Venturini, "Invited Review Photodynamic Antifungal Chemotherapy," *Photochem. Photobiol.*, vol. 88, pp. 512–522, 2012.
- [141] L. M. Giroldo, M. P. Felipe, M. A. De Oliveira, E. Munin, L. P. Alves, and M. S. Costa, "Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*," *Orig. Artic.*, vol. 24, pp. 109–112, 2009.
- [142] G. G. Carvalho, M. P. Felipe, and M. S. Costa, "The Photodynamic Effect of Methylene Blue and Toluidine Blue on *Candida albicans* Is Dependent on Medium Conditions," *J. Microbiol.*, vol. 47, no. 5, pp. 619–623, 2009.
- [143] M. Y. Li, C. S. Cline, E. B. Koker, H. H. Carmichael, C. F. Chignell, and P. Bilski, "Quenching of Singlet Molecular Oxygen (1O_2) by Azide Anion in Solvent Mixtures," *Photochem.*

Photobiol., vol. 74, no. 6, pp. 760–764, 2001.

- [144] L. Huang *et al.*, “Paradoxical potentiation of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation by sodium azide: Role of ambient oxygen and azide radicals,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 53, no. 11, pp. 2062–2071, 2012.
- [145] A. Tavares *et al.*, “Mechanisms of photodynamic inactivation of a Gram-negative recombinant bioluminescent bacterium by cationic porphyrins,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 10, pp. 1659–1669, 2011.
- [146] M. Ochsner, “Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 39, pp. 1–18, 1997.
- [147] D. Keilin, “The Action of Sodium Azide on Cellular Respiration and on Some Catalytic Oxidation Reactions,” *R. Soc.*, vol. 121, no. 822, pp. 165–173, 1936.