



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TRATAMENTO FOTODINÂMICO DE SEMENTES DE TOMATE (*Solanum lycopersicon* MILL.), NA INATIVAÇÃO DA BACTÉRIA *Xanthomonas* spp.

FLÁVIA DE SOUSA FERREIRA

UBERLÂNDIA- MG

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TRATAMENTO FOTODINÂMICO DE SEMENTES DE TOMATE (*Solanum lycopersicon* MILL.), NA INATIVAÇÃO DA BACTÉRIA *Xanthomonas* spp.

FLÁVIA DE SOUSA FERREIRA *

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

Orientação: Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira

Coorientação: Prof. Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi

UBERLÂNDIA- MG

2012



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE Mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em
Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado Acadêmico, NÚMERO 155/COPGQ.

DATA: 30/11/2012

DISCENTE: Flávia de Sousa Ferreira

MATRÍCULA: 11023QMI003

TÍTULO DO TRABALHO: Tratamento fotodinâmico de sementes de tomate (*Lycopersicon
esculentum* MILL.), na inativação da bactéria *xanthomonas* spp.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química Bioinorgânica

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Tratamento fotodinâmico de sementes de tomate
(*Lycopersicon esculentum* MILL.), na inativação da bactéria *xanthomonas* spp.

Às quinze horas do dia trinta de novembro do ano dois mil e doze, no Auditório 3C
(Biblioteca), Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos
Professores Doutores Carla da Silva Meireles, da Universidade Federal do Espírito Santo,
Eduardo de Faria Franca, do Instituto de Química da UFU e Carlos Alberto de Oliveira,
professor orientador e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa
apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e
discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma
Interna nº 01/2010/COPGQ. Em seguida, o presidente da mesa concedeu a palavra ao(à)
candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em
ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de
arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimeada a arguição,
desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os
conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título
do trabalho será o mesmo a uma mencionada.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do
estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As
correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30
dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 45
minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca
Examinadora.

Profª Dra. Carla da Silva Meireles – UFES

Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca – IQUFU

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira – IQUFU

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas bênçãos recebidas.

Aos meus pais e à vovó Ana, pelo apoio e incentivo que sempre me deram.

Ao Diógenes pelo amor, paciência e pela ajuda na manutenção de equipamentos.

À Mariana por ser sempre tão compreensiva com minhas ausências e tão interessada pelo meu trabalho.

Aos amigos do LABIOFOT e do ICIAG em especial ao Erick, Renata, Lucas, Bruno, Márcia, Glaicon, Cilson, Carolina, Sandra e Iara. Obrigada pela amizade e pela ajuda em tantas coisas.

Aos meus amigos que mesmo longe sempre estiveram tão presentes: Adriangela, Cléo, Flávio, Dani, Doug, Grazi, Cássia, Elisane, Juliana e Carla. Sem vocês tudo seria mais difícil.

Ao meu orientador Carlos Alberto de Oliveira, que sempre apoiou minhas idéias e me incentivou. Agradeço por seus ensinamentos e por tornar essa caminhada tão prazerosa.

À professora Nilvanira pela amizade, por acreditar em mim e sempre me ajudar tanto. Você foi um dos melhores encontros que eu tive nos últimos tempos.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.1	Mecanismo tipo I.....	15
1.1.2	Mecanismo tipo II.....	16
1.2	Fotossensibilizadores.....	17
1.2.1	Porfirinas e hematoporfirinas.....	17
1.2.2	Ftalocianinas:.....	19
1.2.3	Fenotiazínicos:.....	20
1.3	Inativação de microorganismos.....	22
1.4	A cultura do tomate.....	24
1.5	Mancha-bacteriana do tomateiro.....	26
1.6	Tratamento de sementes.....	30
2	OBJETIVOS.....	32
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	33
3.1	Preparo do inóculo e da suspensão bacteriana.....	33
3.2	Inativação fotodinâmica da suspensão bacteriana.....	33
3.3	Inoculação e tratamento das sementes:.....	35
3.3.1	Sanidade de sementes de tomateiro.....	37
3.3.2	Teste padrão de germinação das sementes.....	37
3.3.5	Índice de velocidade de emergência.....	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1	Inativação da suspensão bacteriana.....	40
4.2	Sanidade de sementes de tomateiro.....	44

4.3	Teste padrão de germinação, vigor e índice de velocidade de emergência.....	46
5	CONCLUSÕES	49
6	REFERÊNCIAS	50
7.	PROPOSTA DE PESQUISAS FUTURAS.....	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do medicamento Photofrin ® (SIMPLICIO, 2002).....	18
Figura 2: Estrutura dos compostos, porfirina, clorina e bacterioclorina (SETÚBAL, 2007)...	19
Figura 3: Estrutura da ftalocianina de base livre (SETÚBAL, 2007).	20
Figura 4: Estrutura química dos corantes azul de metileno e azul de toluidina (PERUSSI, 2007).....	21
Figura 5: Espectro de absorção de Azul de Metileno em água, nas concentrações $5,0 \times 10^{-6}$ mol. L ⁻¹ , $8,0 \times 10^{-5}$ mol. L ⁻¹ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol. L ⁻¹ (NEUMANN, 2000).	21
Figura 6: (A) Tomateiro cultivado de forma estaqueada. (B) Tomateiro cultivado de forma rasteira. http://www.cnph.embrapa.br/public/folders/tomate.html	24
Figura 7: Aspecto do tomateiro, planta e frutos, portador da mancha bacteriana. http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/tomate/Image20.jpg	27
Figura 8: Equipamento de irradiação, AMS II (DE PAULA, 2010).	34
Figura 9: Esquema para o processo de inativação fotodinâmica da suspensão bacteriana.	35
Figura 10: Esquema para o tratamento de sementes de tomate inoculadas ou não com a bactéria <i>Xanthomonas</i> spp., e tratadas com os corantes.	36
Figura 11: teste padrão de germinação de sementes de tomate tratadas com azul de metileno e irradiadas.	37
Figura 12: Unidade experimental do índice de velocidade de emergência	38
Figura 13: Suspensão bacteriana tratada com Azul de Metileno nas concentrações 0 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, 25 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, 50 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$	40
Figura 14: Suspensão bacteriana tratada com Azul de Toluidina nas concentrações 0 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, 25 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, 50 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$	41
Figura 15: Suspensão bacteriana tratada com Azul de Metileno e Azul de Toluidina nas concentrações: 0 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, 25 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, 50 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$	42

Figura 16: Suspensão bacteriana na concentração 10^2 UFC mL ⁻¹ , tratada com Azul de Metileno na concentração de 25 μ mol. L ⁻¹ . (A) amostra não irradiada e (B) amostra irradiada.	43
Figura 17: Sementes de tomateiro inoculadas com <i>Xanthomonas</i> spp. sem tratamento (A), e a testemunha (B) em meio de cultura 523, após 48 h de incubação a 28 °C.....	44
Figura 18: Sementes de tomateiro inoculadas com <i>Xanthomonas</i> spp (A), tratadas com Azul de Toluidina e não irradiadas (B) e tratadas com Azul de Toluidina e irradiadas (C), em meio de cultura 523, após 48 h de incubação a 28 °C.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EROs – Espécies reativas de oxigênio

UV - Ultravioleta

HPD - Hematoporfirina

AM - Azul de Metileno

AT - Azul de Toluidina

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

PARA - Programa Nacional de Análise de Resíduos de Agrotóxicos

LMR - Limite Máximo de Resíduos de Agrotóxicos

OD - Optical density

TPG - Teste Padrão de Germinação

IVG - Índice de Velocidade de Emergência

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

CV - Coeficiente de Variação

RESUMO

O tomate é uma das culturas de maior expressão no mundo; entretanto várias pragas podem atacar a cultura. A mancha bacteriana, causada pela bactéria *Xanthomonas* spp., é uma das doenças que mais causa perdas na produtividade e na qualidade do tomate, sendo o uso de sementes livres do patógeno uma das formas mais eficazes de controlar a doença atualmente. O presente trabalho estudou uma nova modalidade de tratamento de sementes, eficaz no controle de fitobactérias. Foi efetuado um estudo *in vitro*, da atividade fotodinâmica dos corantes Azul de Metileno, Azul de Toluidina e uma combinação de ambos os corantes, em várias concentrações, sobre uma suspensão contendo *Xanthomonas* spp., onde sob condições de irradiação todos os corantes testados, em todas as concentrações testadas, são capazes de inibir o crescimento bacteriano de forma eficaz. O tratamento de sementes desenvolvido foi eficaz no controle da bactéria sem causar danos à qualidade fisiológica e sanitária das sementes, figurando uma nova modalidade de tratamento de sementes que dispensa o uso de agrotóxicos.

Palavras-chave: ***Xanthomonas* spp., Fotoativação, Tratamento de sementes, Azul de Metileno, Azul de Toluidina.**

ABSTRACT

The tomato crop is a one of the highest expressed cultivation in the world; however, various pests may attack the crop. The bacterial spot, caused by the bacterium *Xanthomonas* spp., is one of the most important diseases that cause losses in yield and quality of tomato and one of the most effective ways to control the disease currently is the use of pathogen-free seeds. This paper studied a new type of seed treatment, effective in controlling fitobactérias. A study in vitro was performed of the photodynamic activity of the dyes Methylene Blue, Toluidine Blue and a combination of both dyes in various concentrations, containing a suspension of *Xanthomonas* spp. The tested dyes are able to inhibit bacterial growth effectively, under irradiation conditions and with all concentrations tested. In this work we developed a seed treatment, and the method tested was effective in controlling bacteria without causing damage quality physiological seed, figuring a new type of seed treatment that avoids the use of pesticides.

Keywords: *Xanthomonas* spp., Photoinactivation, Seed treatment, Methylene blue, Toluidine blue.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fotossensitização e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Há mais de três mil anos os antigos egípcios, tratavam vitiligo usando extratos de plantas seguido da exposição à luz solar (SZEIMIES *et al.*, 2001), tais extratos eram ativados pela radiação UV provocando reações fototóxicas na pele (CESTARI *et al.*, 2007). Em 1900, Raab, estudou a morte de microorganismos através da fotossensitização do corante laranja de acridina, na presença da luz solar. Em 1920 Policard observou que o tecido tumoral continha concentrações mais elevadas de porfirinas que um tecido saudável (MACDONALD *et al.*, 2001) e embora tais porfirinas fossem atóxicas no escuro, na presença de luz e oxigênio poderiam causar sérios danos ao tecido celular. Em 1903 o orientador de Raab, Von Tappeiner, juntamente com Jesionek conduziu os primeiros testes clínicos; Tappeiner foi o primeiro a introduzir o termo “efeito fotodinâmico” para reações de fotossensitização (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Corantes fotossensíveis podem absorver luz, de comprimento de onda específico, na presença de oxigênio molecular resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), citotóxicas, capazes de promover a morte celular por necrose ou apoptose. (PELEGRINO *et al.*, 2005; MACHADO, 2000). O oxigênio singlete é o principal agente citotóxico produzido durante os processos de fotossensitização, é altamente reativo, sendo produzido pela inversão do spin de um dos elétrons mais externos (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001).

Embora existam relatos do uso da fototerapia por volta de 1300 a.C., a descoberta do oxigênio singlete só ocorreu em 1924, e somente em 1963 tornou-se objeto de estudo. Desde então reações onde é produzido oxigênio na forma singlete tem ganhado bastante atenção, em particular, a produção de oxigênio singlete através da fotossensitização (DEROSA; CRUTCHLEY, 2002).

O oxigênio molecular no estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados nos orbitais moleculares degenerados, de mesma energia, π_x^* e π_y^* (MACHADO, 2000), tais elétrons possuem spins paralelos, estão em um estado de energia mais baixo, caracterizando o estado fundamental do oxigênio (O_2) como um estado triplete ($^3\Sigma$). Acima do estado triplete o

oxigênio molecular possui três estados eletronicamente excitados, chamados de oxigênio singlete (DEROSA; CRUTCHLEY, 2002), que diferem entre si nas formas de ocupação dos orbitais moleculares antiligantes, conforme a Tabela 1. Os estados singlete, $^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$, possuem a mesma energia e, portanto são representados por $^1\Delta_g$.

Tabela 1: Possíveis configurações eletrônicas para o oxigênio molecular

Estado	Orbital molecular antiligante	Energia * , KJ.mol $^{-1}$	Tempo de vida (s) em solução aquosa
$^3\Sigma_g$	$[\uparrow] \pi_x^* [\uparrow] \pi_y^*$	0	—
$^1\Delta_x$	$[\uparrow\downarrow] \pi_x^* [] \pi_y^*$	92,4	10^{-6}
$^1\Delta_y$	$[] \pi_x^* [\uparrow\downarrow] \pi_y^*$	92,4	10^{-6}
$^1\Sigma_g$	$[\uparrow] \pi_x^* [\downarrow] \pi_y^*$	159,6	10^{-11}

(MACHADO, 2000)

A forma excitada do oxigênio, $^1\Sigma_g$, possui alta energia e tempo de vida muito curto, e rapidamente decai para os estados $^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$. O oxigênio singlete é bem mais reativo do que sua forma no estado triplete, logo somente a forma $^1\Delta_g$ é responsável por sua reatividade química (DEROSA; CRUTCHLEY, 2002).

Devido ao orbital molecular vazio presente nos estados $^1\Delta_g$, o oxigênio singlete possui caráter eletrofílico, é cerca de 1,0 eV mais oxidante que seu estado triplete podendo reagir rapidamente com substratos ricos em elétrons (SETÚBAL, 2007).

Nas reações de fotossensitização, moléculas fotossensíveis são irradiadas com luz uv-vis de comprimentos de onda específicos, absorvem energia e sofrem transição para o estado singlete excitado ($^1S_1^*$), o tempo de vida do estado singlete excitado é muito curto podendo ocorrer decaimento do estado excitado ($^1S_1^*$) para o estado singlete fundamental (1S_0). A desativação dos estados eletrônicos excitados ocorre através de processos radioativos, com emissão de fluorescência, ou não radioativos onde há uma inversão espontânea do spin e formação do estado triplete excitado ($^3S_1^*$). O estado $^3S_1^*$ pode ainda sofrer decaimento para o estado fundamental via fosforescência (QUINTERO; MIRANDA, 2000). O fotossensitizador

no estado triplete excitado pode interagir com moléculas do meio de duas formas, conhecidas por mecanismos tipo I e tipo II.

1.1.1 Mecanismo tipo I

O mecanismo tipo I ocorre pela transferência de um elétron ou de um átomo de hidrogênio entre o fotossensibilizador no estado triplete excitado ($^3S_1^*$) e moléculas do meio, produzindo íons radicais capazes de reagir com o oxigênio molecular no estado fundamental dando origem a espécies reativas de oxigênio, tais como radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidróxido ($\cdot OH$), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SETÚBAL, 2007).

A molécula do fotossensibilizador absorve luz de comprimento de onda adequado ($h\nu$), sofre transição para o estado singlete excitado ($^1S_1^*$) e através de cruzamento intersistema (ISC), processo no qual o spin do elétron é invertido, passando para o estado triplete excitado ($^3S_1^*$).



O fotossensibilizador no estado triplete excitado ($^3S_1^*$) sofre reações de transferência de elétron ou de um átomo de hidrogênio com uma molécula substrato (M). Nas reações de transferência de elétron a molécula substrato pode sofrer oxidação ou redução.



Transferência de átomos de hidrogênio também pode ocorrer:



1.1.2 Mecanismo tipo II

No mecanismo do tipo II oxigênio singlete é gerado por transferência de energia entre o fotossetizador no estado triplete excitado para o oxigênio no estado fundamental.



Reações de fotossensitização produzem EROs capazes de causar danos irreversíveis a diversos constituintes celulares, tais como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Logo, as reações de fotossensitização têm ampla aplicação terapêutica, como terapia fotodinâmica, purificação do sangue, inativação de microorganismos bem como para finalidades estéticas (QUINTERO; MIRANDA, 2000).

1.2 Fotossensibilizadores

1.2.1 Porfirinas e hematoporfirinas

As porfirinas constituem uma classe de moléculas presente em vários sistemas biológicos, são moléculas cíclicas bastante coloridas, compostas por quatro unidades pirrol, com um átomo de nitrogênio e quatro átomos de carbono (figura 1). As unidades pirrol são conectadas entre si por pontes metálicas, formando um macrociclo, capaz de acomodar íons metálicos em seu interior (SESSLER *et al.*, 2012).

Compostos do grupo heme, contendo ferro, e a clorofila, contendo magnésio, são os representantes mais comuns das porfirinas. Porfirinas são sistemas aromáticos com vinte e dois elétrons π , sendo dezoito elétrons ressonantes.

Por volta de 1908, Walter Hausmann estudou os efeitos fotodinâmicos de extratos de clorofila e hematoporfirina em células vermelhas do sangue. Em 1912 Friedrich Meyer, injetou-se 200 mg de hematoporfirina, em seguida irradiou seu antebraço com a luz de uma lâmpada. O local irradiado sofreu uma leve ulceração, entretanto dias após o tratamento durante exposição à luz solar, Meyer sofreu com reações de fotossensibilidade, inchaço e intenso ardor. (SZEIMMIES *et al.*, 2001). As reações fototóxicas sofridas por Meyer eram causadas por impurezas na mistura de porfirinas. Samuel Schwartz, em 1955 sintetizou um derivado de hematoporfirina (HPD), contendo monômeros e oligômeros de duas a nove unidades de porfirina, desde então, vários derivados de porfirinas foram testados para o uso em terapia fotodinâmica. Derivados hematoporfirínicos são conhecidos como fotossensibilizadores de primeira geração (SIMPLICIO *et al.*, 2002).

O Photofrin[®], o fotossensibilizador mais usado em terapia fotodinâmica, é um exemplo de uma porfirina de uso clínico. Constituído de uma mistura oligomérica de hematoporfina, derivada da porfirina encontrada na hemoglobina, absorve luz de comprimento de onda de aproximadamente 630 nm e, (STERNBERG; DOLPHIN, 1993) apesar de sua ampla utilização no tratamento de diversos tipos de câncer, o Photofrin[®] causa fotossensibilidade cutânea e possui baixa seletividade pelo tecido tumoral (SIMPLICIO *et al.*; 2002).

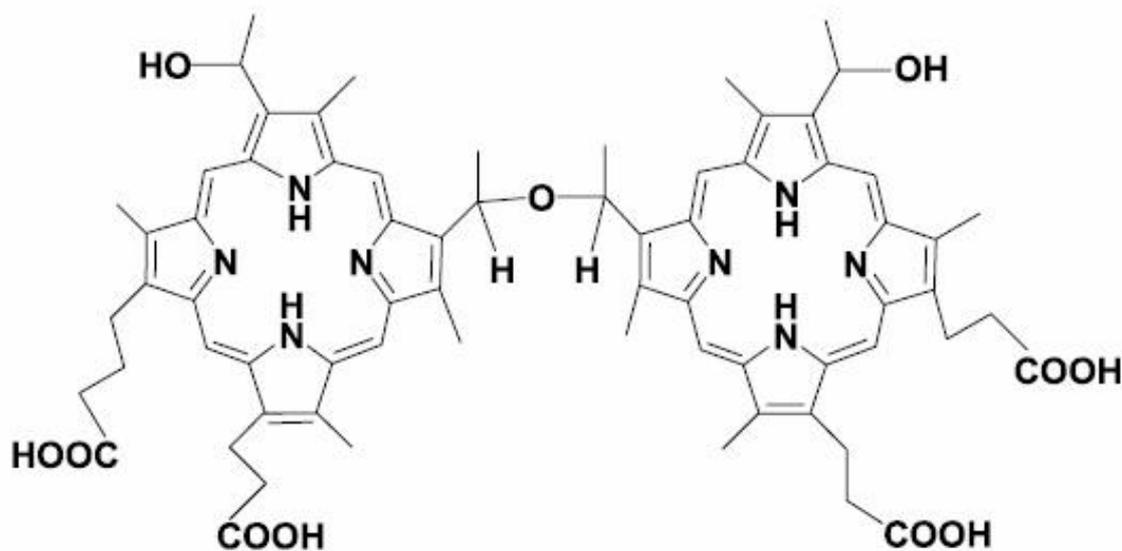


Figura 1: Estrutura química do medicamento Photofrin ® (SIMPLICIO, 2002).

Na tentativa de solucionar as falhas dos compostos porfirínicos de primeira geração, vários estudos e conseqüentemente novos compostos foram descobertos e sintetizados. Entre os compostos mais estudados estão as clorinas.

Clorinas (Figura 2) são moléculas aromáticas, derivadas das porfirinas, possuem um macrociclo com quatro anéis pirrol, onde um dos anéis está na forma reduzida, todos ligados por pontes metínicas. Clorinas contendo o cátion Mg^{2+} , no centro do macrociclo, são chamadas clorofilas, e são os principais pigmentos fotossensíveis nos cloroplastos (SOARES, 2006). As clorinas possuem duas bandas de absorção, de intensidade similar, sendo uma próxima a 400 nm e outra pó volta de 600 nm (DOLPHIN; STERNBERG, 1998).

Outro composto similar às clorinas, porém com dois anéis pirrólicos reduzidos é a bacterioclorina.

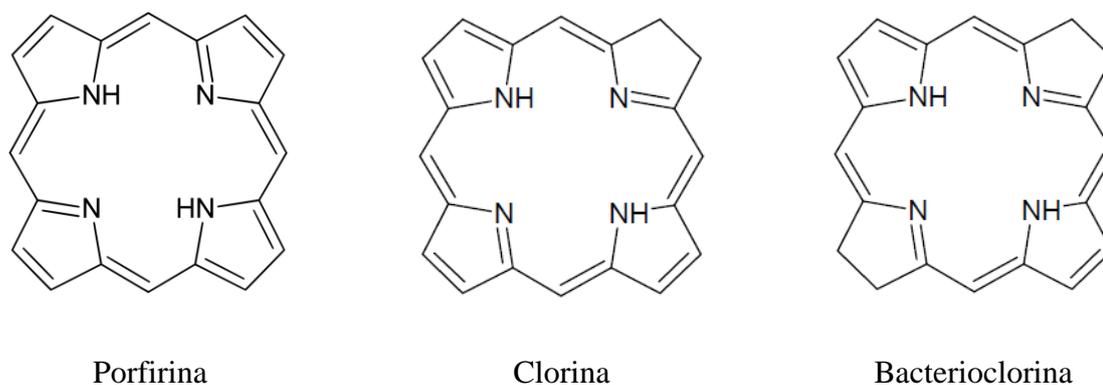


Figura 2: Estrutura dos compostos, porfirina, clorina e bacterioclorina (SETÚBAL, 2007).

1.2.2 Ftalocianinas

A ftalocianina foi descoberta em 1907 por Brawn e Tcherniac, embora ambos não tivessem dado importância, a descoberta despertou o interesse pela investigação desses complexos. Com grande potencial para ser usado como pigmento, as ftalocianinas apresentavam alta estabilidade térmica e baixa solubilidade em água (ZOLLINGER, 2003).

Linsted, em 1933, propôs a estrutura da ftalocianina de base livre (figura 3), e foi o primeiro a usar o nome ftalocianina para descrever a nova classe de compostos orgânicos. Em 1935, por meio de análises de difração de raio-X, Robertson, confirmou a estrutura proposta por Linsted (ZOLLINGER, 2003).

Ftalocianinas são macrociclos de origem sintética, com estrutura semelhante à das porfirinas, onde as pontes metínicas são substituídas por átomos de nitrogênio. A conjugação do macrociclo, nas ftalocianinas, é estendida por anéis benzênicos periféricos, sobre as unidades pirrol. Como consequência as porfirinas e as ftalocianinas possuem forte absorção na região do vermelho no espectro visível (PELEGRINO, 2007).

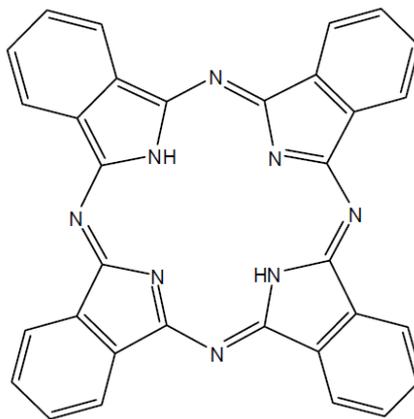


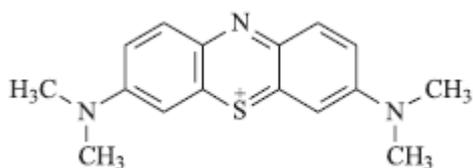
Figura 3: Estrutura da ftalocianina de base livre (SETÚBAL, 2007).

Ftalocianinas apresentam uma banda larga em 350 nm, e duas bandas em 600 e 680 nm, de alta intensidade. Essas bandas de absorção conferem às ftalocianinas uma cor azul intensa (LI-YING *et al.*; 2007).

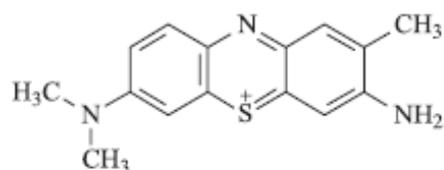
1.2.3 Fenotiazínicos

Os primeiros relatos acerca dos compostos fenotiazínicos datam de 1876, quando Caro reportou a síntese do corante Azul de metileno. Guttman e Ehrlich, em 1891, usaram azul de metileno como uma nova modalidade de tratamento contra malária. Embora o tratamento tenha sido um sucesso, os corantes fenotiazínicos não foram considerados para o uso clínico, devido a sua cor azul associada à sua característica de corar diversos tecidos. A eficácia antimalárica dos compostos fenotiazínicos continuou a ser estudada, mas a possível coloração da pele do paciente era vista como uma desvantagem inviabilizando o uso desses compostos (WAINWRIGHT; AMARAL, L, 2005 ; PERUSSI, 2007).

Corantes fenotiazínicos são compostos azuis, catiônicos, com estrutura formada por um sistema planar de anéis aromáticos altamente conjugados. A figura 4 mostra as estruturas dos corantes azul de metileno (AM) e azul de toluidina (AT). Devido a suas características estruturais os fenotiazínicos são bons fotossensibilizadores, com intensa absorção na região visível, do espectro eletromagnético (PERUSSI, 2007).



Azul de metileno



Azul de toluidina

Figura 4: Estrutura química dos corantes azul de metileno e azul de toluidina (PERUSSI, 2007).

Os monômeros do corante azul de metileno possuem bandas de absorção fortes em comprimentos de onda entre 550 e 700 nm, com absorção máxima em 664 nm. O espectro de absorção é dependente da concentração já que em altas concentrações, o azul de metileno possui tendência de formar dímero. Enquanto monômeros tem absorção máxima em 664 nm, os dímeros absorvem em 590 nm. Monômeros e dímeros podem estar envolvidos em diferentes tipos de reações fotoquímicas que podem afetar o mecanismo de morte celular (TARDIVO *et al.*; 2005). A figura 5 mostra o espectro de absorção do azul de metileno em três concentrações diferentes.

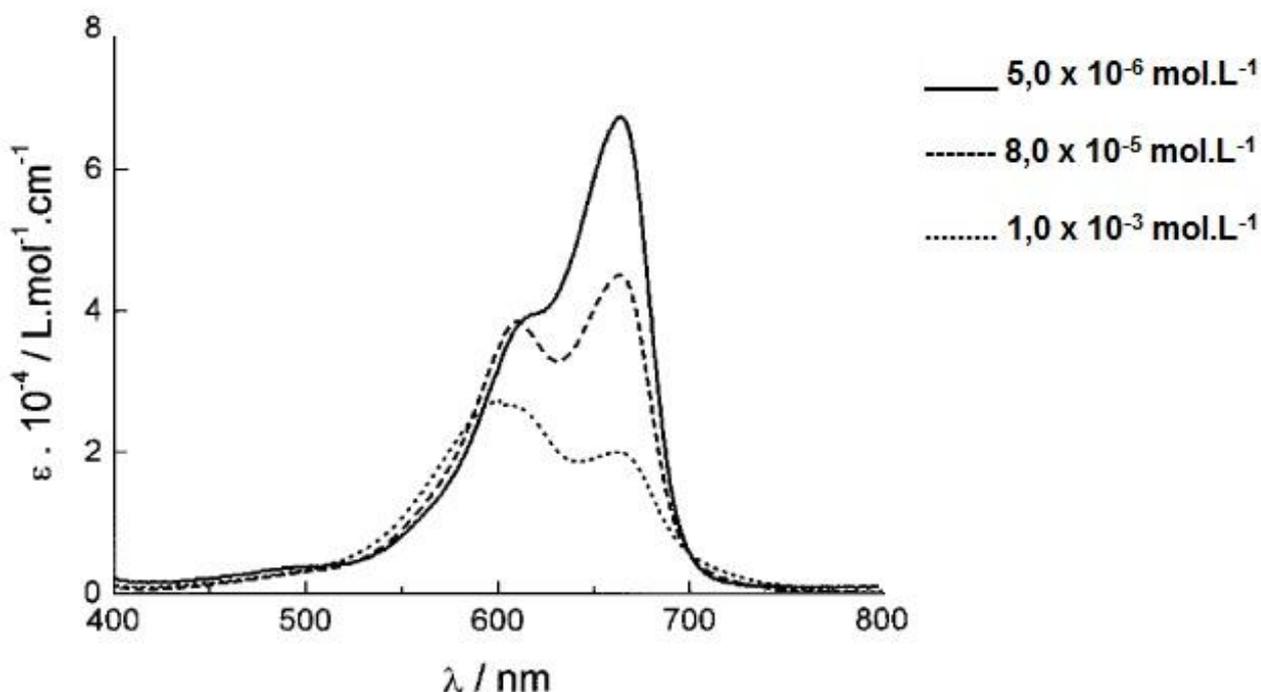


Figura 5: Espectro de absorção de Azul de Metileno em água, nas concentrações $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$, $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ (NEUMANN, 2000).

Para a solução mais diluída observa-se somente uma banda com comprimento de onda máximo em aproximadamente 670 nm, correspondente aos monômeros de Azul de Metileno. À medida que a concentração da solução aumenta é observado o aparecimento de uma nova banda em 605 nm atribuída aos dímeros do corante, acompanhada da diminuição na intensidade da absorção, no comprimento de onda correspondente aos monômeros (NEUMANN, 2000). O corante azul de toluidina exibe comportamento parecido com o azul de metileno, onde o aumento da concentração do corante está associado ao aumento da formação de dímeros e trímeros (JEBARAMYA, 2009).

Em condições em que a concentração de dímeros é alta, as reações fotoquímicas do tipo I predominam e a geração de oxigênio singlete é praticamente abolida. Reações de fotossensitização induzidas tanto por AM quanto por AT podem causar severos danos às biomoléculas, tendo em vista que os corantes podem sofrer desativação do estado excitado através de reações do tipo I e do tipo II (TARDIVO *et al.*, 2005).

1.3 Inativação de microorganismos

Microorganismos podem ser mortos através de reações de fotossensitização em um processo chamado de inativação fotodinâmica. A inativação de microorganismos através da fotossensitização já era conhecida antes da segunda guerra mundial, onde a eficácia e as possíveis aplicações da terapia fotodinâmica já havia sido demonstrada contra vírus, bactérias e protozoários, entretanto, devido à popularização dos antibióticos a técnica foi abandonada. (PERUSSI, 2007).

No entanto, muitos patógenos, em especial bactérias, são resistentes às drogas antimicrobianas disponíveis, no mercado, atualmente. A resistência de alguns microorganismos pode ser natural ou adquirida, sendo que a droga antimicrobiana, embora não seja a única causa da resistência, é capaz de selecionar em uma população os microorganismos mais resistentes (SVENSATER e WELIN, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2009). É comum bactérias, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, desenvolverem resistência à antibióticos, tais como a penicilina e a vancomicina. Apenas dois anos depois da introdução da penicilina em 1940, já havia relatos de estirpes bacterianas resistentes à droga (PHOENIX e SAYED, 2003).

Já a seleção de estirpes fúngicas tolerantes ocorre tanto em espécies patogênicas quanto em fungos fitopatogênicos, onde indivíduos imunocomprometidos e o uso indiscriminado de fungicidas favorecem a seleção de cepas resistentes aos agentes antimicrobianos utilizados atualmente (GONZALES *et al.*, 2010). Tem sido reportada, por exemplo, a resistência fúngica do dermatófito *Trichophyton rubrum*, principal agente causador da infecção onicomicose, além do aumento de outras infecções dermatófitas causado pelo crescimento do número de pacientes com o sistema imune comprometido, ou portadores de diabetes mellitus (SMIJS e PAVEL, 2010).

A maioria das drogas antifúngicas não leva à morte do patógeno, mas apenas inibem sua multiplicação. Do mesmo modo, devido à rapidez com que se multiplicam, qualquer bactéria que possa viver na presença de um antibiótico logo predominará sobre a população microbiana (TANAKA e KINOSHITA, 2012). Sendo assim, a inativação fotodinâmica mostra-se uma importante alternativa para o controle de microorganismos patogênicos e fitopatogênicos, em resposta à crescente resistência desses microorganismos aos antibióticos.

Os mecanismos de ação da inativação fotodinâmica de microorganismos é bastante diferente dos antibióticos, onde um mesmo fotossensibilizador pode ser usado contra vários microorganismos. Reações de fotossensibilização produzem espécies reativas de oxigênio, em especial oxigênio singlete, capazes de oxidar compostos orgânicos insaturados tais como os lipídeos que compõe a membrana celular (PERUSSI, 2007). Além de danos às membranas celulares os fotossensibilizadores ainda podem causar severos danos ao DNA e inviabilizar enzimas essenciais (PINTON *et al.*, 2012; PHOENIX *et al.*, 2003).

Experiências *in vitro* demonstraram a eficácia dos fenotiazínicos, azul de metileno e azul de toluidina contra *Staphylococcus aureus* resistentes (ZOLFAGHARI e PACKER, 2009; HUSSAIN *et al.*, 2006) demonstraram a eficácia dos corantes azul de metileno e azul de toluidina contra *Escherichia coli*, embora não tenham elucidado os mecanismos precisos de ação dos corantes. DE PAULA (2010), mostrou que Azul de metileno em concentrações próximas à $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ foi capaz de inibir significativamente o crescimento de *Staphylococcus aureus in vitro*.

1.4 A cultura do tomate

O tomateiro é uma planta dicotiledônea pertencente à família das *Solanaceaes*, denominado de *Lycopersicon esculentum* Mill, mas reclassificado e agrupado na espécie *Solanum lycopersicum* (PERALTA et al., 2006). Embora seja uma planta perene o tomateiro é cultivado como uma cultura anual. A planta é incapaz de suportar o peso dos próprios frutos, onde dependendo do destino da produção a cultura pode ser estaqueada ou conduzida na forma rasteira (Figura 6) (MARANCA, 1981; MINAMI, 1980).



(A)



(B)

Figura 6: (A) Tomateiro cultivado de forma estaqueada. (B) Tomateiro cultivado de forma rasteira. <http://www.cnpq.embrapa.br/public/folders/tomate.html>

O tomate é originário da América do Sul (WARNOCK, 1991; MINAMI, 1980), mais precisamente da região do Equador até o norte do Chile. Foi domesticado no México e levado para a Europa por volta de 1493. Acreditava-se que o tomate era extremamente venenoso, mas devido aos belos frutos amarelos era usado como planta ornamental. Os espanhóis introduziram o tomate na alimentação e a planta foi difundida entre os povos do mediterrâneo. Levado para a França, o tomate, passou a ser comercializado com os Estados Unidos em 1875, e com o Canadá, onde foi processado, industrialmente, pela primeira vez (MINAMI, 1980).

Hoje o tomate está espalhado por todo o planeta, é destaque entre as hortaliças brasileiras. Em 2011 a produção nacional chegou a 4,4 milhões de toneladas, em 69 mil hectares. Na última década a área plantada e a produção agrícola tem aumentado, mantendo a produtividade agrícola (IBGE, 2012).

O tomate e seus produtos derivados são fontes importantes de vários nutrientes tais como a vitamina C, vitamina A e potássio (GIOVANNUCCI, 1999). Também é rico em fitoquímicos sendo o licopeno o mais estudado devido suas propriedades antioxidantes. O licopeno é o carotenóide responsável pela cor vermelha do fruto; é altamente lipofílico conferindo resistência às células contra o dano oxidativo (HADLEY e CLINTON, 2003), estudos apontam o licopeno como um poderoso anticarcinogênico. Devido as propriedades antioxidantes do licopeno, o consumo do tomate está relacionado à prevenção de diversos tipos de câncer (CAMPBELL e ADAMS, 2004; SINGH e GOYAL, 2008).

O tomate tem despertado o interesse dos pesquisadores, devido à qualidade nutricional do fruto e ao intenso uso de defensivos agrícolas usados na cadeia produtiva, tanto os frutos quanto a cultura do tomateiro vem sendo amplamente estudada. Entre esses estudos destacam-se a presença de resíduos tóxicos e a determinação de compostos antioxidantes e nutrientes.

As indústrias químicas que produziam venenos com finalidades militares, após as guerras mundiais, encontraram na agricultura um mercado promissor para seus produtos desde então os pesticidas vem sendo amplamente usados em todo o mundo (LONDRES, 2011) impulsionado pela valorização estética dos produtos agrícolas e como uma alternativa capaz de garantir o aumento e a qualidade da produtividade agrícola (ALVES FILHO, 2002). No Brasil indústria de formulações de agrotóxicos surgiu em 1948, a partir de então o consumo e a produção de agrotóxicos cresceu significativamente. Segundo dados da FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, (FAO, 2011) entre os anos de 1991 e 2001 o uso de fungicidas e bactericidas no Brasil praticamente quadruplicou.

Várias doenças podem atacar o tomateiro aumentando a frequência do uso de agrotóxicos em lavouras (LATORRACA, 2008). Embora os pesticidas possam garantir alimento suficiente e de qualidade para a população, seu uso traz riscos à saúde humana e ao meio ambiente (CALDAS; SOUZA, 2000). Seus resíduos podem estar presentes nos alimentos e na água potável causando doenças à saúde humana que podem ser agudos ou crônicos, alguns fungicidas, são associados a doenças como câncer, alergias respiratórias e doença de Parkinson (RIBAS e MATSUMURA, 2009).

Atualmente a preocupação dos consumidores e cientistas com a saúde humana e com o meio ambiente tem pressionado a indústria do agronegócio a desenvolver produtos com menos agrotóxicos e mais ricos nutricionalmente. Em uma pesquisa realizada em várias cidades na Alemanha, sobre a preferência dos consumidores por alimentos orgânicos, (KRIWY e MECKING, 2012) observaram que os motivos que levam tais consumidores a comprarem produtos orgânicos são a preocupação com o meio ambiente e com a saúde. Os consumidores consultados são dispostos inclusive a gastar mais com produtos orgânicos, onde o estudo mostrou que a renda não tem relação com os gastos no consumo, embora o consumo aumente com o aumento da renda familiar.

É crescente também a preocupação dos governos com o uso indiscriminado de pesticidas. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável por controlar e fiscalizar o uso e a produção de agrotóxicos. O programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA), criado em 2001 pela ANVISA, monitora o limite máximo de resíduos (LMR) de agrotóxicos nos alimentos in natura.

Existe então, a necessidade de pesquisas e do desenvolvimento de práticas agrícolas e técnicas capazes de garantir o aumento da produtividade agrícola em bases sustentáveis, minimizando os riscos à saúde associados ao consumo de alimentos contaminados com resíduos tóxicos.

1.5 Mancha-bacteriana do tomateiro

A mancha bacteriana é uma das mais sérias doenças do tomate, em regiões com clima quente e úmido o desenvolvimento da doença se dá de forma extremamente grave (MANSFIELD *et al.*, 2012).

O patógeno pode atacar todas as partes aéreas da planta, destruindo o tecido foliar e expondo os frutos ao sol (Figura 7). Essa intensa exposição à luz solar, dos frutos, leva a uma diminuição no teor de açúcar comprometendo assim a qualidade do produto. Outro sintoma associado à mancha-bacteriana é o aparecimento de manchas marrons nas folhas, onde sob condições de calor e alta umidade do ar tomam o aspecto encharcado. As manchas acometem também o caule, as flores e os frutos, levando à queda dos frutos ou comprometendo sua qualidade para o comércio (LOPES e DUVAL, 2005).



Figura 7: Aspecto do tomateiro, planta e frutos, portador da mancha bacteriana. <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/tomate/Image20.jpg>

O patógeno associado à mancha-bacteriana é composto por algumas espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas*. O qual é formado por bactérias gram-negativas e aeróbicas, formam colônias amarelas em meio Nutriente Agar devido ao pigmento xantomonadina, possuem em média de 1 a 1,8 μm de diâmetro onde todas as espécies descritas são fitopatogênicas (FERREIRA e SALGADO, 1995).

As bactérias causadoras da mancha bacteriana, tanto em pimentão quanto em tomate, possuem uma variabilidade genética muito grande. Esta variabilidade do patógeno começou a ser mais bem esclarecida quando se observou que os isolados provenientes de tomate hidrolisavam amido e os de pimentão não (BURKHOLDER; LI, 1941). Posteriormente, Dye (1966) confirmou que isolados oriundos de pimentão hidrolisavam amido mais fracamente que aqueles de tomate. Logo, estabeleceram-se dois diferentes grupos causadores da mancha bacteriana (VAUTERIN et al., 2000): *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (sem atividade amidolítica) e *X. vesicatoria* (amidolítico positivo). Estudos incluindo testes de patogenicidade, bioquímicos, atividade enzimáticas, marcadores genéticos, hibridização DNA-DNA e comparação de seqüências de RNA, concluíram que dentro do grupo das *Xanthomonas* patogênicas ao tomate e pimentão existem quatro grupos fenotípicos distintos, que foram classificados como três espécies distintas: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupos A e C), *X. vesicatoria* (grupo B) e *X. gardneri* (grupo D) (JONES et al., 2000). Jones et al.

(2004) propuseram uma reclassificação do grupo, onde *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* foi denominada como *Xanthomonas euvesicatoria* (grupo A) e foi incluído no grupo, além das três espécies já existentes, o táxon *X. perforans* (grupo C) entre os agentes causadores da mancha bacteriana. Além disso, isolados de cada espécie podem ser caracterizados quanto a raças, de acordo com o comportamento de causar ou não reação de hipersensibilidade, em variedades diferenciais de tomate e pimentão (STALL et al., 2009).

Isolados da raça T1 tem sido agrupados no grupo fenotípico “A”, da raça T2 no grupo “B” ou no grupo “D” e da raça 3 no grupo “C” (QUEZADO-DUVAL; CAMARGO, 2004). Sendo portanto, a composição espécie, grupo e raça como: *X. euvesicatoria* (grupo A, raça T1), *X. vesicatoria* (grupo B, raça T2), *X. perforans* (grupo C, raças T3, T4 e T5) e *X. gardneri* (grupo D, raça T2) (LOPES; QUEZADO-DUVAL, 2007).

A mancha bacteriana foi primeiramente observada em plantas de tomate na África do Sul em 1914. No Brasil, a doença foi relatada primeiramente por Batista em 1947, na região Nordeste, causando prejuízos em mudas e plantações de pimentão, e um pouco mais tarde, no estado do Rio de Janeiro (ROBBS, 1953).

A doença apresenta uma gama de hospedeira bastante diversificada dentro da família botânica Solanaceae. Espécies como *Capsicum frutescens*, *Lycopersicon pimpinellifolium*, *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger*, *H. aureus*, *Lycium chinense*, *L. halimifolium*, *Nicotiana rustica*, *Physalis minima*, *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *S. rostratum*, *S. tuberosum*, *S. melongena* e *Nicandra physaloides*, já foram verificadas como espécies hospedeiras naturais da bactéria ou a partir de inoculações artificiais (DYE et al., 1964; LAUB; STALL, 1967; JONES; STALL, 1998).

Os sintomas da mancha-bacteriana ocorrem em toda parte aérea da planta, podendo aparecer em qualquer estágio da cultura (GITAITIS et al., 1992). Nas folhas os primeiros sintomas aparecem na forma de pequenas áreas encharcadas de formato irregular, porém com bordos definidos, que se tornam deprimidas passando de uma coloração amarelada ou verde-clara para marrom-escura até a necrose dos tecidos (GOODE; SASSER, 1980). Nas peças florais, usualmente, o ataque resulta em sérios declínios de florescimento. Já em frutos verdes, aparecem manchas levemente elevadas, que comumente têm halos branco-esverdeados, e alargam-se entre 3 a 6 mm de diâmetro (HIGGINS, 1922; KUROZAWA; PAVAN, 1997; LOPES; QUEZADO-DUVAL, 2005).

Diferentemente do que ocorre em plantas de pimentão, no tomateiro, a mancha bacteriana não leva à queda das folhas. Com o coalescimento das lesões foliares, ocorre a secagem e a destruição da folhagem a partir da parte inferior da planta, favorecendo o

aparecimento nos frutos com sintomas de queima de sol (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997).

A bactéria não sobrevive no solo por longos períodos, entretanto, pode sobreviver em restos culturais ou epifitamente na superfície foliar do tomateiro ou demais hospedeiras (RODRIGUES NETO, 2000). A doença é favorecida por temperaturas entre 22,5 e 27,5°C e alta umidade relativa (MORTON, 1965). As fitobactérias têm capacidade de multiplicarem-se à custa de exsudados do hospedeiro sem infectá-lo, e assim incrementar a quantidade de inóculo até o suficiente para o surgimento de uma epidemia, como no caso de *Xanthomonas vesicatoria* em tomate (LEBEN, 1963). A bactéria penetra na planta através dos estômatos ou através de ferimentos provocados por equipamentos ou tratos culturais como amarrio e desbrota (VAKILI, 1967). A doença é disseminada por respingos de água a curta distância (ROMEIRO, 2005), por mudas (LEBEN, 1963), ou sementes infectadas a longa distância (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997).

Opções de controle da mancha-bacteriana incluem o uso de cultivares resistentes à doença, e o controle químico feito com antibióticos e produtos à base de cobre. Entretanto poucos genótipos resistentes foram identificados (LOBO, 2005).

Entre os antibióticos mais usados, no Brasil, para o controle da doença no campo, estão a estreptomicina e a oxitetraciclina, além de produtos cúpricos. No entanto existem relatos de resistência de alguns patógenos tanto à estreptomicina quanto ao cobre, tornando baixa a eficácia dessas drogas em lavouras de tomate e de pimentão. DUVAL *et al.*, (2003) avaliaram a frequência de isolados resistentes ao cobre e aos antibióticos estreptomicina e oxitetraciclina em populações de *Xanthomonas* spp. provenientes de campos de tomate para processamento industrial em diversas regiões do Brasil. Entre 88 e 100% dos isolados estudados foram resistentes à estreptomicina, a resistência ao cobre foi bem menor, no entanto chegou a apresentar uma frequência de 78% de isolados resistentes.

O emprego de produtos à base de cobre e estreptomicina em lavouras de tomate, com finalidade de controlar a mancha bacteriana, não apresenta perspectivas promissoras, tornando imprescindível o desenvolvimento de técnicas alternativas para o controle da doença. A eficiência de compostos à base de cobre na redução da população de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em isolados de pimentão, não resultou na diminuição da severidade da doença (DUVAL *et al.*, 2003; CARMO *et al.*, 2001; AGUIAR *et al.*, 2003), comprovando que o controle químico é pouco viável para o uso no campo de cultivo.

1.6 Tratamento de sementes

A principal forma de contaminação da planta, por espécies de *Xanthomonas*, é através de sementes infectadas pela bactéria. Baixos níveis de contaminação da semente, pelo patógeno, podem causar severas epidemias e grandes perdas no campo (CARMO *et al.*, 2004). Assim um dos métodos de controle da mancha-bacteriana mais eficiente, é o uso de sementes livres do patógeno obtidos através de tratamentos prévios ou provenientes de lavouras livres da doença (ROMEIRO, 2005; LOPES e DUVAL, 2005).

Tratamentos de semente eficientes devem ser capazes de inativar o patógeno causando o mínimo de danos à viabilidade das sementes, podendo ser através dos métodos físicos e químicos (CARMO *et al.*, 2004).

A termoterapia é o principal método físico utilizado, e incluem métodos de controle do patógeno através do calor. Entre esses métodos está a imersão das sementes em água aquecida, o uso de ar quente e de correntes de vapor. A temperatura, na termoterapia, deve ser bem controlada já que as sementes, assim como os patógenos, também podem ser sensíveis ao calor (CARMO *et al.*, 2004; GRONDEAU e SAMSON, 1994). Logo, a eficiência da termoterapia depende da sensibilidade da semente a temperaturas elevadas.

SILVA *et al.* (2002) observaram uma diminuição no vigor de sementes de tomate tratadas em uma estufa, com circulação forçada de ar, à aproximadamente 70 °C, por um período de 96 h. No entanto, devido a ausência de patógenos responsáveis pela redução da qualidade fisiológica das sementes, foi observado também uma melhora no desenvolvimento das plântulas.

O tratamento químico de sementes, visando o controle de fitobactérias, é feito geralmente, utilizando substâncias desinfetantes, tais como ácidos em baixas concentrações e bactericidas, mas tais compostos, podem influenciar negativamente a germinação e o vigor das sementes. Estudos comparativos entre métodos termoterápicos e métodos químicos, usando ácido clorídrico (CARMO *et al.*, 2004) indicam que os tratamentos térmicos utilizando água aquecida ou calor a seco, não possuem ação residual. Embora tais tratamentos sejam capazes de afetar a flora bacteriana das sementes, seu uso deve estar associado ao uso complementar de fungicidas para a proteção das sementes contra a reinfestação por patógenos presentes no solo. O tratamento químico com ácido clorídrico

mostrou-se eficiente no controle da bactéria *Xanthomonas* spp., mas indicou prejuízo à qualidade das sementes (MARINGONI e KUROZAWA, 1994; CARMO *et al.*, 2004).

Diante dos problemas relacionados aos tratamentos de sementes mostrados, fica evidente a necessidade de mais estudos e do desenvolvimento de novas técnicas capazes de erradicar os patógenos presentes nas sementes sem prejudicar a qualidade fisiológica das mesmas.

2 OBJETIVOS

- Avaliar a eficácia dos corantes Azul de Metileno, Azul de Toluidina e a combinação de ambos, em concentrações diferentes na inativação fotodinâmica da suspensão bacteriana de *Xanthomonas* spp.
- Efetuar o tratamento fotodinâmico de sementes de tomate inoculadas com a bactéria, utilizando os corantes Azul de Metileno, Azul de Toluidina bem como a combinação de ambos.
- Avaliar a qualidade fisiológica e sanitária das sementes tratadas com os diferentes corantes.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Preparo do inóculo e da suspensão bacteriana

O isolado bacteriano UFU A35 de *Xanthomonas* spp., proveniente de Araguari MG, pertencente à coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia foi cultivado em meio de cultura 523 (KADO e HESKETT, 1970), com a seguinte composição: 10g de sacarose, 4g de extrato de levedura, 8g de caseína hidrolisada, 2g de K₂HPO₄ anidro, 0,3g de MgSO₄, 20g de ágar e 1L de água destilada.

A suspensão bacteriana foi preparada em solução salina (NaCl 0,85%), sendo ajustada em espectrofotômetro para OD₅₅₀=0,5 correspondendo a aproximadamente 1x10⁹ UFC.mL⁻¹ (MARCUIZZO et al., 2009).

3.2 Inativação fotodinâmica da suspensão bacteriana

Os corantes Azul de Metileno, Azul de Toluidina e a combinação dos dois (1:1) foram preparados em solução salina (NaCl 0,85%) nas concentrações de 25µmol.L⁻¹, 50µmol.L⁻¹ e 100µmol.L⁻¹, e esterilizados em autoclave horizontal, por 30 minutos à 120 °C.

Frações de 500 µL da suspensão bacteriana foram colocadas em oito tubos plásticos de 1,5 mL onde, a dois tubos foi adicionado 500 µL de solução salina, aos outros tubos foi adicionado, em pares, 500 µL de solução do corante, nas concentrações de 25 µmol.L⁻¹, 50 µmol.L⁻¹ e 100 µmol.L⁻¹.

Todos os tubos foram incubados no escuro, recobertos com papel alumínio, por 20 minutos, em estufa a 28°C. Após o tempo de incubação um tubo de cada tratamento foi deixado no escuro em temperatura ambiente, como controle, e os demais foram irradiados com o equipamento AMS-II (DE PAULA, 2010), por 20 minutos; sendo que todos os tubos irradiados foram mantidos a 5 cm de distância da fonte de iluminação. O equipamento AMS-

II (Figura 8) é composto por um sistema de LED de alta potência, possuindo pico de emissão em 652 nm.



Figura 8: Equipamento de irradiação, AMS II (DE PAULA, 2010).

Após a irradiação a suspensão bacteriana foi diluída em série de 10^8 UFC.mL⁻¹ a 10^2 UFC.mL⁻¹. Foi transferido 100 μ L de cada tratamento, para todas as diluições, para duas placas de Petri contendo meio de cultura 523 e mantido em estufa bacteriológica à 28° C por 48h, quando foi avaliado a porcentagem de controle do número de UFC.mL⁻¹. A Figura 9 mostra o esquema do procedimento descrito para a inativação fotodinâmica da suspensão bacteriana.

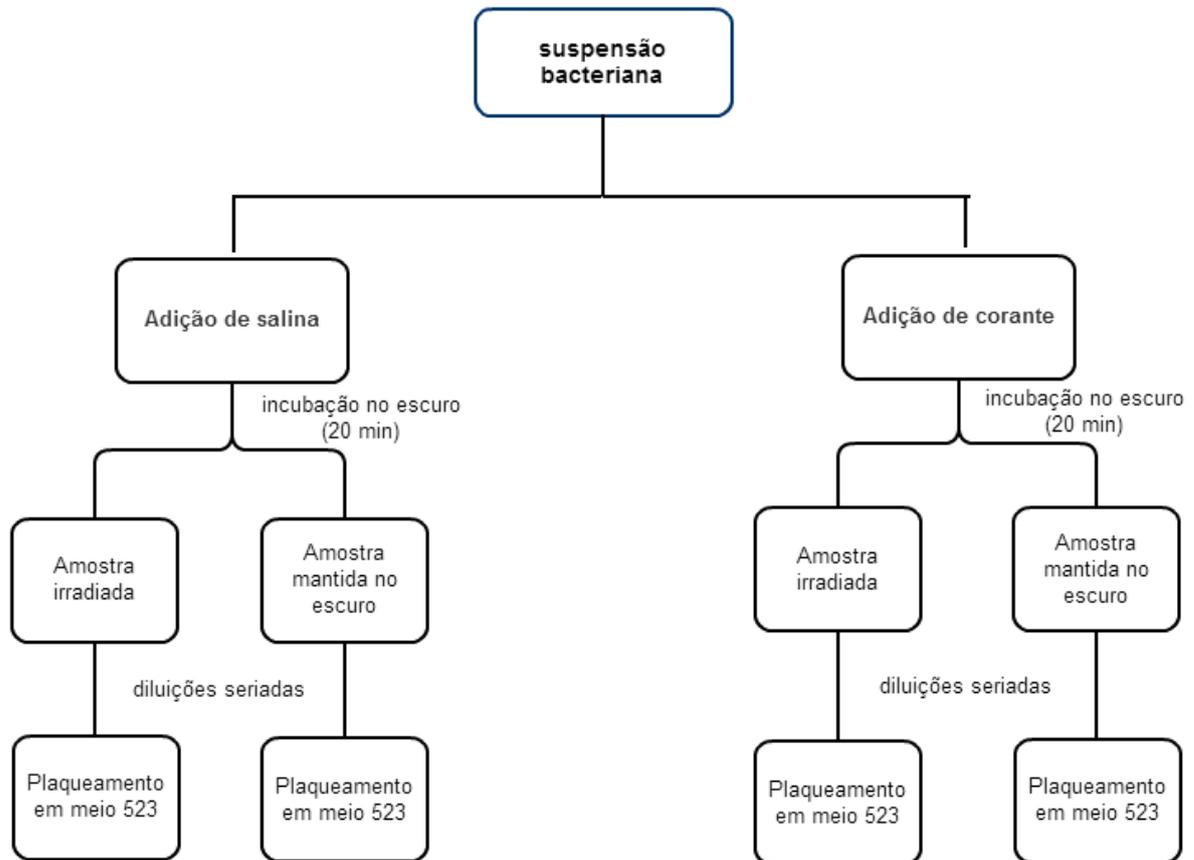


Figura 9: Esquema para o processo de inativação fotodinâmica da suspensão bacteriana.

3.3 Inoculação e tratamento das sementes

Sementes comerciais de tomate da cultivar Santa Clara, gentilmente cedidas pela empresa Sakata Seed Sudamerica LTDA, sem nenhum tipo de tratamento prévio foram utilizadas.

Inicialmente 2000 sementes foram desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por três minutos e lavadas com água deionizada. 1500 sementes foram imersas em uma suspensão de *Xanthomonas* spp., e às outras 500 sementes foi adicionado solução salina. Todas as sementes foram mantidas em geladeira por 24h, em seguida foram secas em capela de fluxo laminar. As sementes que não foram inoculadas com a suspensão bacteriana foram utilizadas como testemunha.

Mil sementes inoculadas foram divididas em duas placas de Petri contendo 500 sementes cada uma, onde a cada placa foi adicionado 5 mL da solução dos corantes na concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Ambas as placas foram incubadas no escuro, em estufa a 28°C , por 20 minutos. Em seguida uma placa foi mantida no escuro enquanto a outra foi irradiada com o equipamento descrito no item 3.2, por 20 minutos. A Figura 10 mostra o esquema para o procedimento utilizado.

500 sementes inoculadas com a bactéria e não tratadas foram utilizadas como controle.

O tratamento das sementes foi repetido para cada um dos corantes AM, AT e para a combinação de ambos. Onde foi avaliada a sanidade das sementes, teste padrão de germinação e o índice de velocidade de germinação das plântulas.

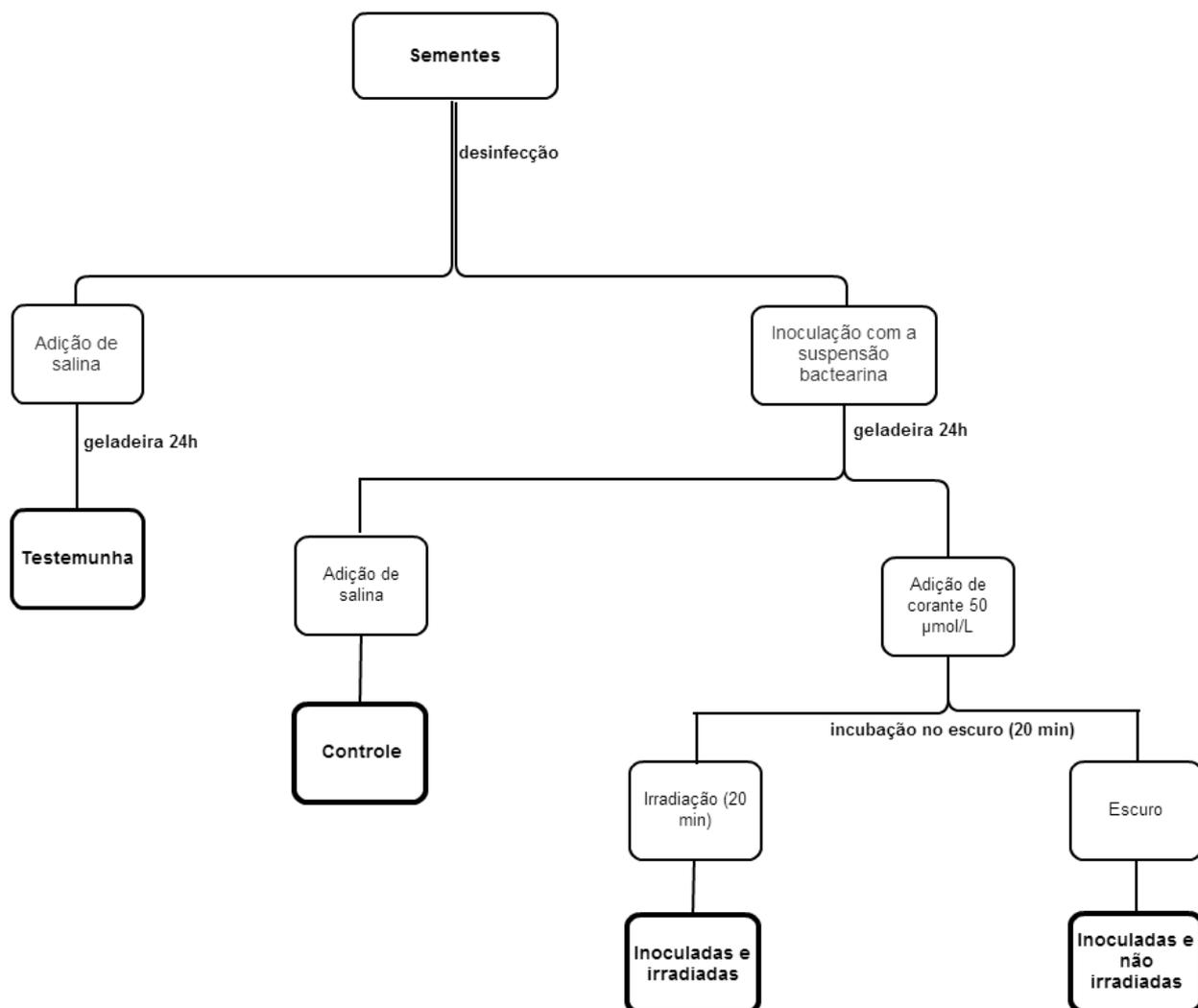


Figura 10: Esquema para o tratamento de sementes de tomate inoculadas ou não com a bactéria *Xanthomonas* spp., e tratadas com os corantes.

3.3.1 Sanidade de sementes de tomateiro

Para o teste de sanidade das sementes não inoculadas, inoculadas com a bactéria e tratadas pelos diferentes corantes, sob irradiação e não irradiadas foram utilizadas 100 sementes, as quais foram colocadas em placas de Petri, contendo o meio de cultura 523, e incubadas em estufa à 28 °C por 48h. Após esse período foi avaliado a porcentagem de sementes contaminadas.

O ensaio foi conduzido em delineamento de blocos inteiramente casualizados, com 4 repetições de 25 sementes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de médias (Tukey 5%), com o auxílio do software SISVAR[®] (FERREIRA, 2008).

3.3.2 Teste padrão de germinação das sementes

As sementes tratadas foram colocadas para germinação, com espaçamento uniforme e suficiente para minimizar a competição e a contaminação entre elas, sobre papel. As folhas de papel foram colocadas em caixas de plástico transparente, tipo gerbox, e umedecidas com água deionizada (BRASIL, 2009). As caixas foram levadas ao germinador, em temperatura alternada de 20° C e 30°C, e fotoperíodo a cada 12h. Foram utilizadas 200 sementes com oito repetições de 25 sementes (Figura 11).



Figura 11: Teste padrão de germinação de sementes de tomate tratadas com azul de metileno e irradiadas.

A primeira contagem das sementes germinadas foi feita a partir do 5º dia e a contagem final ao 14º dia e o resultado expresso em porcentagem de germinação.

O ensaio foi em delineamento em blocos ao acaso, para a análise estatística da porcentagem de germinação os foram transformados em arco-seno $(x/100)^2$ e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do software SISVAR® (FERREIRA, 2008).

3.3.5 Índice de velocidade de germinação

Para o índice de velocidade de germinação o ensaio foi conduzido em casa de vegetação, sendo avaliado 200 sementes de cada tratamento. As sementes foram colocadas em bandejas de isopor, com dimensões de 25 cm x 20 cm, contendo uma camada uniforme de areia umedecida e cobertas com areia, de forma a se obter uma camada de aproximadamente 1 cm sobre as sementes, onde a umidade foi mantida à 60% (Figura 12).



Figura 12: Unidade experimental do índice de velocidade de germinação

A contagem de plantas emergidas foi realizada do 1º ao 14º dia, após o início do teste. Foi calculado o índice de velocidade de emergência (IVG) pela Equação 8:

$$IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n \quad (8)$$

IVG= índice de velocidade de germinação

G_1, G_2, G_n = número de plântulas normais computadas na primeira, na segunda e na última contagem.

N_1, N_2, N_n = número de dias da primeira, segunda e última contagem.

O ensaio foi em delineamento de blocos casualizados, com 8 repetições, sendo a unidade experimental composta por uma bandeja com 25 sementes, para a análise estatística da porcentagem de germinação os foram transformados em arco-seno $(x/100)^2$ e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do software SISVAR® (FERREIRA, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inativação da suspensão bacteriana

Nas suspensões bacterianas tratadas com azul de metileno e irradiadas não foi observado crescimento bacteriano (Figura 13), evidenciando que todas as concentrações testadas do azul de metileno, são tóxicas à bactéria exibindo um controle de 100%. No entanto, embora em menor escala, o azul de metileno mostrou-se tóxico também no escuro, à *Xanthomonas* spp, onde a concentração de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi capaz de controlar aproximadamente 44% do crescimento bacteriano, a concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi responsável por um controle de 16,6 % e o azul de metileno à uma concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ controlou o crescimento da bactéria em 45%.

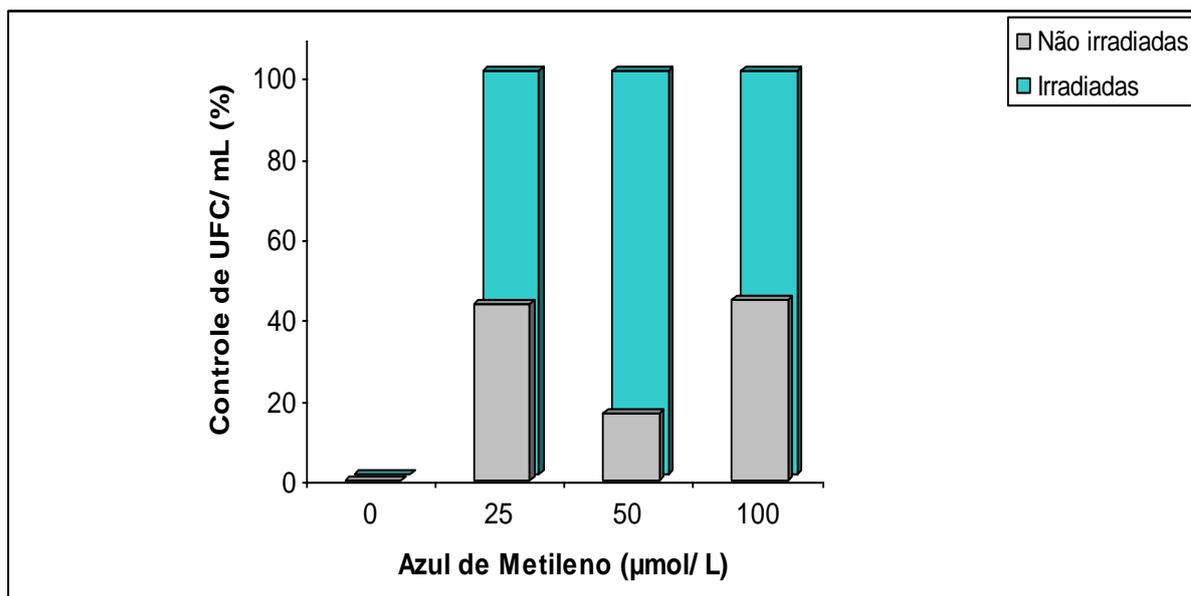


Figura 13: Suspensão bacteriana tratada com Azul de Metileno nas concentrações 0 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, 25 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, 50 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, sob irradiação e não irradiadas, UFU, Uberlândia.

O composto AM possui alta afinidade por proteínas presentes na membrana e na parede celular bacteriana (USACHEVA *et al.*, 2008), no entanto concentrações maiores do corante favorecem a formação de dímeros (TARDIVO *et al.*, 2005) sugerindo que na concentração de 50 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ a formação dos dímeros seria responsável por inibir a interação do

corante com tais proteínas, causando menor dano à célula bacteriana. Na concentração de 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, embora haja a presença de dímeros o excesso de AM seria responsável pela inibição do crescimento bacteriano no escuro.

O corante azul de toluidina mostrou-se extremamente tóxico à bactéria, *Xanthomonas* spp, em todas as concentrações testadas, tanto em condições onde as amostras foram irradiadas quanto em condições de escuro, sendo que não houve crescimento de unidades formadoras de colônia para nenhuma amostra tratada com azul de toluidina (Figura 14).

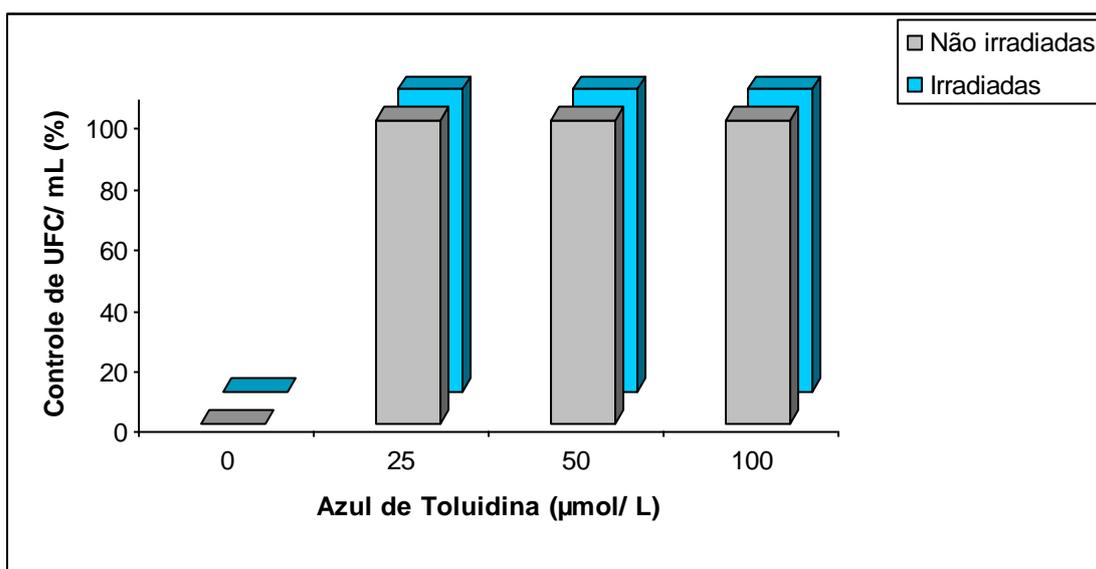


Figura 14: Suspensão bacteriana tratada com Azul de Toluidina nas concentrações 0 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, 25 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, 50 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, sob irradiação e não irradiado, UFU, Uberlândia.

Embora AM e AT possuam propriedades fotofísicas e fotoquímicas semelhantes, os corantes exibem eficiências fotodinâmicas diferentes sobre bactérias. Uma possibilidade é que os corantes interagem com a membrana ou a parede celular de formas diferentes.

Os corantes AM e AT são catiônicos e interagem predominantemente com moléculas aniônicas tais como lipopolissacarídeos e proteínas, entretanto AM interage melhor com proteínas enquanto AT interage melhor com os lipopolissacarídeos formando complexos metacromáticos (USACHEVA *et al.*, 2008). Tais complexos seriam responsáveis pelo aumento do comportamento tóxico do AT comparado ao AM.

A combinação dos corantes azul de metileno e azul de toluidina, em qualquer concentração testada, nas amostras irradiadas é eficiente no controle do crescimento bacteriano (Figura 15).

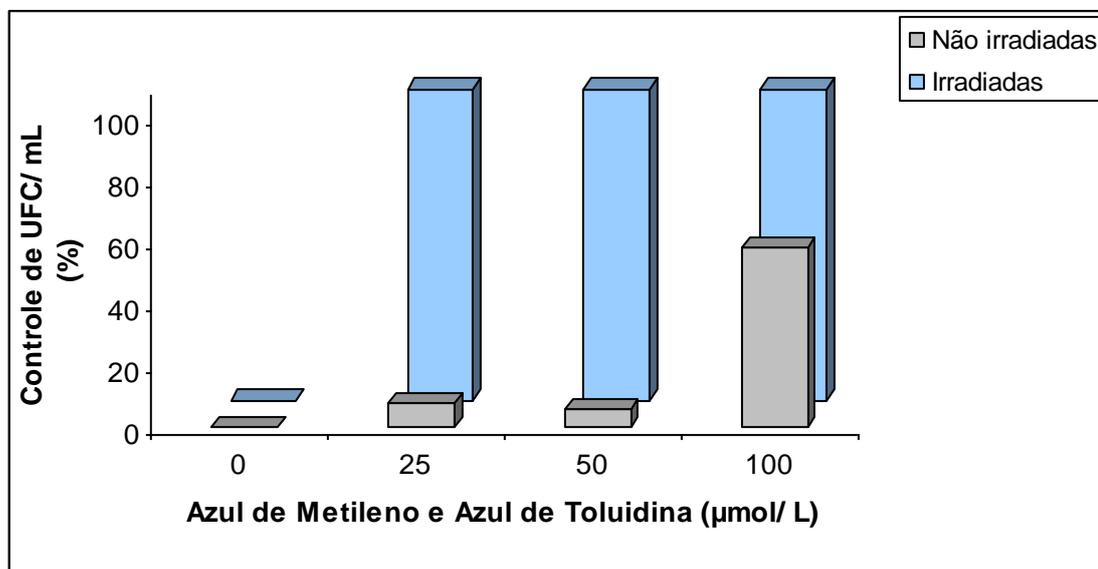


Figura 15: Suspensão bacteriana tratada com Azul de Metileno e Azul de Toluidina nas concentrações: 0 µmol. L⁻¹, 25 µmol. L⁻¹, 50 µmol. L⁻¹ e 100 µmol. L⁻¹, sob irradiação e não irradiado, UFU, Uberlândia.

Nas amostras mantidas no escuro houve controle da bactéria em menor escala do que nas amostras irradiadas, entretanto na concentração final de 100 µmol L⁻¹ da mistura de corantes foi observado um controle das unidades formadoras de colônia de 58%, enquanto que nas concentrações de 25 µmol L⁻¹ e 50 µmol L⁻¹ a capacidade de controle foi menor que 10%. A combinação dos corantes exibe menor toxicidade no escuro do que o Azul de Metileno e o Azul de Toluidina usados de forma individual.

De acordo com os resultados obtidos tanto o Azul de Metileno quanto o Azul de Toluidina são agentes fotossensibilizadores efetivos na inativação da bactéria *Xanthomonas* spp. sendo capazes de erradicar completamente o crescimento bacteriano. A Figura 16 mostra duas placas contendo a suspensão bacteriana tratada com Azul de Metileno, sob condições de escuro e sob condições de irradiação.

Os corantes testados são hidrofílicos e catiônicos, tais características permitem a passagem desses compostos pela membrana celular através dos canais de proteínas presentes

na parede celular das bactérias gram-negativas (USACHEVA *et al.*, 2001). Corantes fotossensíveis podem absorver luz, de comprimento de onda específico, na presença de oxigênio molecular resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), citotóxicas, capazes de promover a morte celular por necrose ou apoptose (PELEGRINO *et al.*, 2005; MACHADO, 2000).

O Azul de Toluidina é considerado um eficaz agente fotodinâmico destruidor da membrana, o qual se liga aos polifosfatos da membrana externa e produz danos moleculares para os lipídios e proteínas, inclusive a membrana enzimática (mesossomo) (USACHEVA *et al.*, 2001) responsável pela geração de energia.

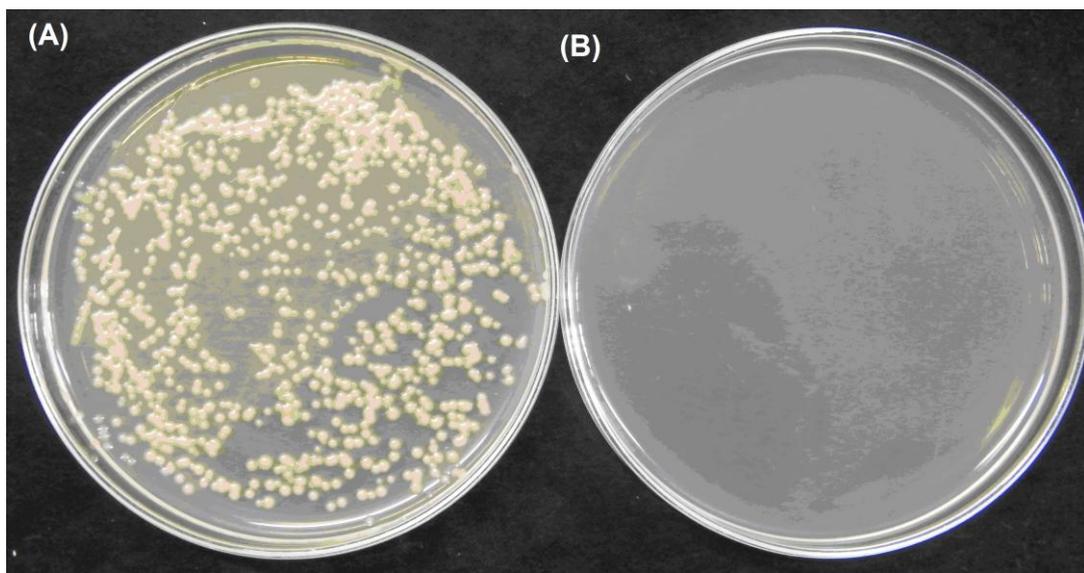


Figura 16: Suspensão bacteriana na concentração 10^2 UFC mL⁻¹, tratada com Azul de Metileno na concentração de 25 μ mol. L⁻¹. (A) amostra não irradiada e (B) amostra irradiada, UFU, Uberlândia.

Devido às diferenças na composição química da parede celular, bactérias gram-positivas são mais suscetíveis à terapia fotodinâmica do que as gram-negativas. Fatores responsáveis pelas diferenças na susceptibilidade à inativação fotodinâmica incluem a permeabilidade da membrana celular, mecanismos de reparação do DNA, ou o tamanho da célula microbiana (DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004).

A susceptibilidade das espécies gram-positivas é explicada por sua fisiologia. A membrana plasmática é rodeada de uma camada relativamente porosa de peptidoglicano, que

permite a passagem do fotossensibilizador pela membrana celular. Bactérias gram-negativas possuem além da membrana plasmática, uma parede celular que funciona como uma barreira física entre a célula e o ambiente. Na parede celular externa das bactérias gram-negativas encontram-se diferentes proteínas envolvidas na integridade estrutural da membrana, na função enzimática e na formação de poros responsáveis pela passagem de nutrientes. O mecanismo de morte celular pode ocorrer devido a danos ao DNA ou à parede celular (HAMBLIN e HASAN, 2004; JORI *et al.*, 2006).

No entanto organismos gram-negativos possuem a membrana citoplasmática com alto teor de lipídeos aniônicos e zwitteriônicos, e assim moléculas catiônicas podem interagir com a membrana formando uma espécie de cobertura sobre a camada lipídica carregada negativamente ou promovendo agrupamento dos lipídeos em uma região da membrana onde os cátions se encontram, formando poros capazes de levar ao vazamento lento do conteúdo intracelular. Moléculas catiônicas podem ainda provocar uma redistribuição dos lipídeos da membrana diminuindo a disponibilidade desses lipídeos, necessários à função de proteínas específicas (EPAND e EPAND, 2011).

4.2 Sanidade de sementes de tomateiro

As sementes inoculadas com a bactéria apresentaram uma porcentagem de contaminação de 94%, enquanto que nas sementes não inoculadas (testemunha) não foi observada contaminação (Figura 17).

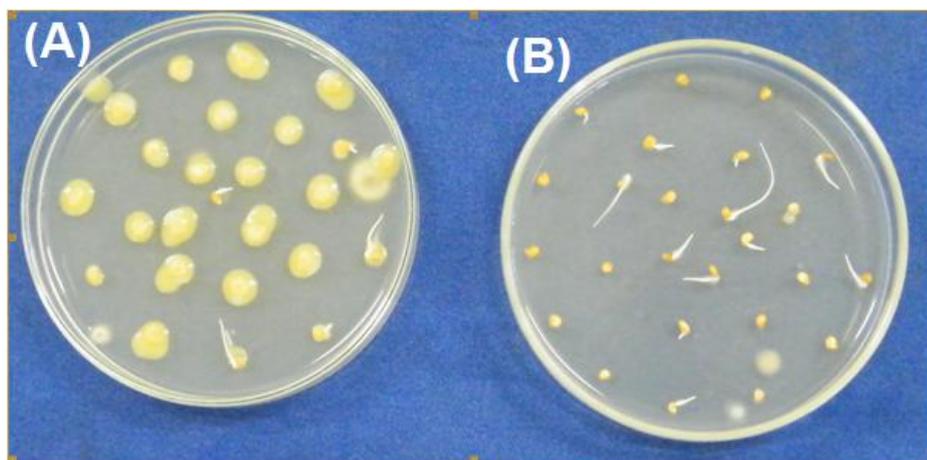


Figura 17: Sementes de tomateiro inoculadas com *Xanthomonas* spp. sem tratamento (A), e a testemunha (B) em meio de cultura 523, após 48 h de incubação a 28 °C, UFU, Uberlândia.

As sementes de tomateiro tratadas com Azul de Metileno e irradiadas ou não (Tabela 2) apresentaram 40 e 49% de contaminação, respectivamente, diferindo significativamente das sementes inoculadas (94%), o que significa uma redução de 58 e 48% de sementes contaminadas. O Azul de Toluidina mostrou maior toxicidade à bactéria do que o Azul de Metileno, onde as sementes tratadas apresentaram 24 e 34% de contaminação quando irradiadas ou não, respectivamente, correspondendo uma redução de sementes contaminadas de 75 e 64%, respectivamente, quando comparada com as sementes inoculadas (94%).

A combinação dos corantes Azul de Metileno e Azul de Toluidina apresentou maior efeito fototóxico sobre as bactérias contidas nas sementes do que os corantes individuais. Para sementes tratadas com os dois corantes simultaneamente e irradiadas a contaminação foi de apenas 1% e nas sementes tratadas e mantidas no escuro a contaminação foi de 13%, diferindo significativamente das sementes inoculadas. Somente a associação dos dois corantes mostrou maior eficácia em amostras irradiadas do que em amostras que não receberam luz.

Tabela 2: Porcentagem de sementes de tomateiro contaminadas, inoculadas com *Xanthomonas* spp., tratadas com os corantes Azul de Metileno, Azul de Toluidina e Azul de Metileno e Toluidina, irradiadas ou não com o equipamento AMS-II. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia MG, 2011.

Sementes	Sementes contaminadas (%)		
	Azul de Metileno	Azul de Toluidina	(Azul de Metileno + Toluidina)
Controle	94 c	94 c	94 c
Testemunha	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Inoculadas e irradiadas	40 b	24 b	1,0 a
Inoculadas e não irradiadas	49 b	34 b	13 b
CV (%)	12,56	12,25	14,21

Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey 5%.

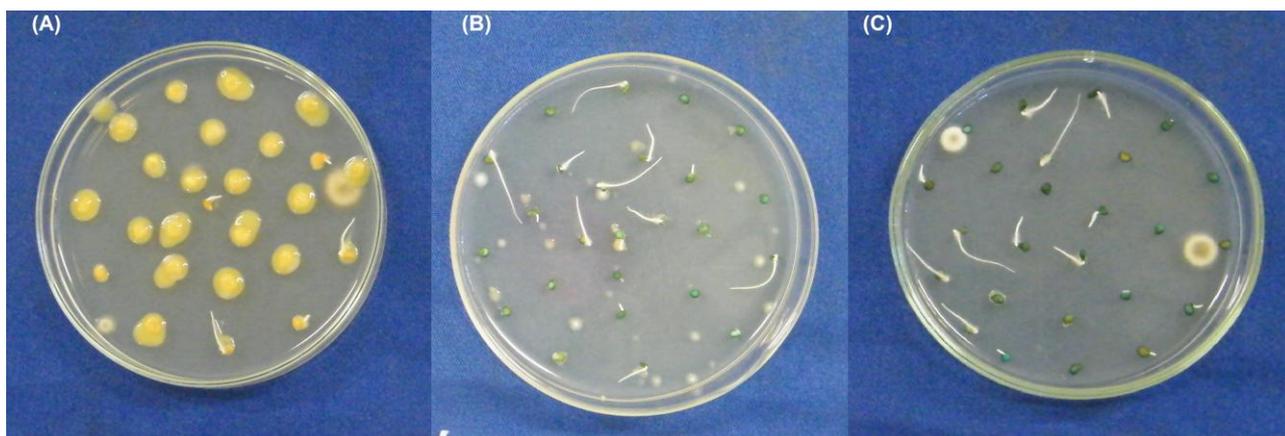


Figura 18: Sementes de tomateiro inoculadas com *Xanthomonas* spp (A), tratadas com Azul de Toluidina e não irradiadas (B) e tratadas com Azul de Toluidina e irradiadas (C), em meio de cultura 523, após 48 h de incubação a 28 °C, UFU, Uberlândia.

As sementes de tomateiro quando inoculadas com *Xanthomonas* spp. (Figura 18A) apresentaram 94% das sementes contaminadas, e após o tratamento com Azul de Toluidina e irradiadas (Figura 18C) houve uma erradicação total da bactéria nas sementes.

Cabe salientar que este é um trabalho inédito em que se utiliza os corantes Azul de Metileno e Toluidina associados à irradiação no tratamento de sementes de importância agrícola para o controle de bactérias fitopatogênicas, demonstrando ser uma técnica promissora, excluindo o uso de agrotóxicos e preservando o meio ambiente. Além de não existir no mercado produtos eficazes para o controle de fitobactérias.

4.3 Teste padrão de germinação, vigor e índice de velocidade de germinação

Na primeira contagem do teste padrão de germinação (Tabela 3) não houve diferença significativa entre as sementes inoculadas, as sementes inoculadas irradiadas ou não na porcentagem de germinação para os corantes utilizados.

Para o índice de velocidade de germinação não houve diferença entre os tratamentos, no entanto as sementes inoculadas e irradiadas apresentaram um índice ligeiramente maior.

Os diferentes corantes não interferiram na qualidade fisiológica das sementes, podendo figurar uma nova modalidade de tratamento de sementes, capaz de promover o controle de bactérias fitopatogênicas, sem prejudicar a qualidade fisiológica e sanitária das sementes.

As sementes tratadas com Azul de Metileno e não irradiadas apresentaram maior germinação do que sementes inoculadas e não tratadas, e sementes não inoculadas. Resultados similares foram observados em sementes tratadas com Azul de Toluidina, indicando que o uso de Azul de Metileno ou de Azul de Toluidina, tanto sob ação da luz quanto no escuro tem efeito positivo sobre a germinação das sementes.

Embora o tratamento das sementes feito com a combinação dos corantes tenha exibido excelentes resultados sobre a sanidade das sementes, seu uso pode causar danos sobre a germinação das mesmas quando comparado com a testemunha.

Tabela 3: Sementes de tomateiro inoculadas com *Xanthomonas* spp., tratadas com Azul de Metileno, Azul de Toluidina e Azul de Metileno e Toluidina, na concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ irradiadas ou não, pelo teste padrão de germinação (TPG), vigor (1^a. G) e índice de velocidade de emergência (IVG) . Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia MG, 2011.

Sementes	Azul de Metileno			Azul de Toluidina			Azul de Metileno e Azul de Toluidina		
	1 ^a .G (%)	TPG (%)	IVG	1 ^a .G (%)	TPG (%)	IVG	1 ^a . G (%)	TPG (%)	IVG
Controle	64 a	66a	2,63 a	72 a	73 a	3,50 a	44 a	47 a	3,75 a
Testemunha	75 a	79 ab	3,00 a	74 a	86 ab	4,00 a	75 b	77 b	3,75 a
Inoculadas e irradiadas	79 a	90 b	3,13 a	86 a	92 b	4,00 a	64 ab	70 ab	4,00 a
Inoculadas e não irradiadas	77 a	82 ab	2,75 a	83 a	87 ab	4,00 a	64 ab	65 ab	3,75 a
CV (%)	16,92	13,92	17,39	10	8,68	7,45	14,58	16,22	12,56

Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey 5%.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) estão presentes em todas as fases de vida das sementes e exercem papel fundamental sobre sua fisiologia (LEYMARIE, *et al.*, 2012). Durante a embebição de sementes, aproximadamente 3% do oxigênio utilizado pelas mitocôndrias é convertido em ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (BAILLY *et al.*, 2008).

Tem sido mostrado que durante a germinação de sementes de várias espécies há uma acumulação de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico, sugerindo que EROs podem ter diversas funções no processo de germinação. EROs podem promover a morte programada de células que revestem o endosperma, oxidar proteínas e desencadear a expressão do gene específico; quebrando a dormência das sementes e favorecendo a germinação (BAILLY *et al.*, 2008).

BAILLY *et al.*, (2008) proporam um conceito de janela oxidativa para a germinação, onde qualquer concentração de EROs abaixo ou acima dos limites dessa janela impede a germinação ou diminuem o vigor das sementes.

5 CONCLUSÕES

Os corantes foram eficazes no controle da bactéria *Xanthomonas* spp., sendo que a combinação de Azul de Metileno e Azul de Toluidina possui maior potencial citotóxico, sobre a bactéria, em condições com irradiação, do que os corantes usados individualmente.

Os corantes não interferiram na qualidade fisiológica das sementes.

Os corantes Azul de Metileno e Azul de Toluidina exibem efeitos semelhantes sobre a germinação e o vigor das sementes tratadas. Ambos são capazes de melhorar a germinação sem prejudicar o vigor das sementes, podendo figurar uma nova modalidade de tratamento de sementes capaz de promover o controle de bactérias fitopatogênicas sem prejuízos à sua qualidade fisiológica e sanitária.

Os corantes podem ser uma tecnologia promissora no tratamento de sementes para o controle de fitobactérias, excluindo o uso de agrotóxicos.

6 REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. A., KIMURA, O., CASTILHO, A. M. C., CASTILHO, K. S. C., RIBEIRO, R. D. L., AKIBA, F., CARMO, M. G. F. Efeito de formulações cúpricas e cuproorgânicas na severidade da mancha-bacteriana e na população residente de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em pimentão. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 21, n. 1, p. 44-50, 2003.

ALVES FILHO, J. P. A difusão do controle químico na agricultura brasileira. In: ALVES FILHO, J. P. *Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos*. São Paulo: Annablume; Fapesp, cap. II, p. 57-80, 2002.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTALIÇAS. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2010. Disponível em: <
http://www.gaz.com.br/tratadas/eo_edicao/6/2010/03/20100316_b777017f6/pdf/2943_hortalicas.pdf> Acessado em 12/ 02/ 2012.

BAILLY, C.; BOUTEAU, H. EL-M.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biologies*, France, v. 331, p. 806-814, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 398p.

BURKHOLDER, W.H.; LI, C.C. Variation in *Phytomonas vesicatoria*. *Phytopathology, Saint Paul*, v.31, p.753-755, 1941.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000.

CAMPBELL, J. K.; ADAMS, K. C.; LINDSHIELD, B. L.; BOILEAU, T. W. M.; CLINTON, S. K.; JR, J. W. E. Tomato phytochemicals and prostate cancer risk. *JN journal of nutrition*, v. 134, n. 12, p. 3486S-3492S, 2004.

CARMO, M. G. F.; MACAGNAN, D.; CARVALHO, A. D. Progresso da mancha-bacteriana do pimentão a partir de diferentes níveis de inóculo e do emprego ou não do controle com oxiclureto de cobre. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 19, n. 3, p. 210-215, 2001.

CARMO, M. G. F.; CORREA, F. M.; CORDEIRO, E.S.; CARVALHO, A. O.; ROSSETTO. Tratamentos de erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* e efeitos sobre a qualidade das sementes de tomate. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 22, n.3, p. 579-584, 2004.

CAVARIANI, C.; PIANA, Z.; TILLMANN, M. A. A.; MINAMI, K. Métodos de remoção da mucilagem e qualidade fisiológica de sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Sci. Agríc.*, Piracicaba, v. 50, n. 3, p. 43-46, 1994.

CESTARI, T. F.; PESSATO, S.; CORRÊA, G. P. Fototerapia- aplicações médicas. *Anais brasileiros de dermatologia*, Brasil, v. 82, n. 1, p. 7-21, 2007.

DE PAULA, L. F. Desenvolvimento de dispositivos de irradiação utilizando LED e sua aplicação à fotoinativação de *Staphylococcus aureus* e *Trichophyton rubrum*. 2010. 127f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

DEMIDOVA, T. N., HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy target to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol*, v. 17, n. 3, p. 245-254, 2004.

DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and applications. *Coordination chemistry reviews*, Ottawa, Canadá, v. 233-234, p. 351-371, 2002.

DOLPHIN, D., STERNBERG, E. D. Porphyrin-based Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Tetrahedron*. N. 54. p. 4151-4202, 1998.

DUVAL, A. M. Q., FILHO, A. G., JUNIOR, R. P. L., CAMARGO, L. E. A. Sensibilidade ao cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associados à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 21, n. 4, p. 670-675, 2003.

DYE, D.W. Cultural and biochemical reaction of additional *Xanthomonas* species. New Zealand Journal of Science, Wellington, v.9, p. 913-919, 1966.

EPAND, R. M.; EPAND, R. F. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *Journal of Peptide Science*, v. 17, n. 1, p. 298-305, Maio, 2011.

FERREIRA, L. P.; SALGADO, G. L. Bactérias. In: MONTEIRO, A. R. et al. *Manual de fitopatologia*. 3° ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995. cap. 5, p. 97-131.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. *FAOSTAT Agriculture Data*. FAO, 2008. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>. Acessado em 13/ 08/ 2011.

GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 91, n. 4, p. 317-331, 1999.

GITAITIS, R.; McCARTER, S.; JONES, J.B. Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. *Plant Disease*, Saint Paul, v.76, n.7, p.651-656, 1992.

GOODE, M.J.; SASSER, M. Prevention- the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. *Plant Disease*, Saint Paul, v.64, n.9, p.831-834, 1980.

GONZALES, F. P., DA SILVA, S. H., ROBERTS, D. W., BRAGA, G. U. L. Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. *Photochemistry and Photobiology*. v. 86, n. 3, p. 653-661, 2010.

GRONDEAU, C.; SAMSON, R. A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, especially seeds from bacteria. *Critical Review in Plant Sciences*. v. 13, n. 1, p. 57-75, 1994.

HADLEY, C. W.; CLINTON, S. K.; SCHUWARTZ, S. J. The consumption of processed tomato products enhances plasma lycopene concentrations in association with a reduced lipoprotein sensitivity to oxidative damage. *JN journal of nutrition*, v. 133, n. 3, p. 727-732, Março, 2003.

HAMBLIN, M. R., HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photchem Photobiol Sci*, USA, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.

HIGGINS, B.B. The bacterial spot of pepper. *Phytopathology*, Saint Paul, v.12, p.501-516, 1922.

HUSSAIN, S., HARRIS, F., PHOENIX, D. A. The phototoxicity of phenothiazinium- based photosensitizers to bacterial membranes. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, UK, v. 46, n. 1, p. 124-130. 2006.

IBGE. *Levantamento sistemático da produção agrícola*. Brasília, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Relatório técnico), 2012. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201205> acessado em 20/04/2012

JEBARAMYA, J.; ILANCHELIAN, M.; PRABAHAR, S. Spectral studies of toluidine blue o in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. Índia, v. 4, n. 4, p. 789-791, 2009.

JONES, J.B; STALL, R.E. Diversity among *Xanthomonas* pathogenics on pepper and tomato. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 36, p. 41-58, 1998.

JONES, J.B.; BOUZAR, H.; STALL, R.E.; ALMIRA, E.C.; ROBERTS, P.D.; BOWEN, B.W; SADBERRY, J.; STRICKLER, P.M.; CHUN, J. Systematic analysis of *Xanthomonas* (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v. 50, p.1211-1219, 2000.

JONES, J.B., LACY, G.H; BOUZAR, H., STALL, R.E., SCHAAD, N.W. Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v.27, p.755–762, 2004.

JORI, G.; FABRIS, C.; SONCIN, M.; FERRO, S.; COPPELLOTTI, O.; DEI, D.; LIA, F.; CHITI, G.; RONCUCCI, G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basics principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 38, n. 5, p. 468-481, 2006.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 969-979, 1970.

KRIWY, P.; MECKING, R. A. Health and environmental consciousness, costs of behavior and the purchase of organic food. *International Journal of Consumer Studies*, Germany, v. 36, n. 1, p. 30-37, 2012.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do Tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. E.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). *Manual de Fitopatologia*. São Paulo: Ceres, 1997, v.2, p. 614-615.

LATORRACA, A.; MARQUES, G. J. G.; SOUSA, K. V.; FORNÉS, N. S. Agrotóxicos utilizados na produção do tomate em Goiânia e Goianápolis e efeitos na saúde humana. *Com. Ciências Saúde*, v. 19, n. 4, p. 365-374, 2008.

LAUB, C.A.; STALL, R.E. An evaluation of *Solanum nigrum* and *Physalis minima* as susceptes of *Xanthomonas vesicatoria*. *Plant Disease Reporter*, Washington, v. 51, p. 659-661, 1967.

LEBEN, C. Multiplication of *Xanthomonas vesicatoria* on tomato seedlings. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 53, p.778-781, 1963.

LEYMARIE, J.; VITKAUSKAITÉ, G.; HOANG, H. H.; GENDREAU, E.; CHAZOULE, V.; MEIMOUN, P.; CORBINEAU, F.; BOUTEAU, H. EL-M.; BAILLY, C. Role of reactive oxygen species in the regulation of Arabidopsis seed dormancy. *Plant Cell Physiol.*, v. 53, n. 1, p. 96-106, 2012.

LI-YING, C., YANG, J., FU, Q., ZHAO, B., TIAN, L., YU, H. Synthesis, crystal structure and characterization of a new zinc phthalocyanine complex. *Journal of Molecular Structure*. v. 827, n. 1-3, p. 149-154, 2007.

LOBO, V. L. S., GIORDANO, L. B., LOPES, C. A. Herança da resistência à mancha bacteriana em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*. Brasil, v. 30, n. 4, p. 343-349, 2005.

LONDRES F. Por quê campeão em agrotóxicos?. In: LONDRES, F. *Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida*. 1ª edição. Rio de Janeiro: AS-PTA_ Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa. cap. 1, p. 17-24, 2011.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. *Doenças bacterianas das hortaliças – diagnose e controle*. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 70 p.1997.

LOPES, C. A.; DUVAL, A. M. Q. Doenças bacterianas. In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. et al. *Doenças do Tomateiro*. Embrapa Hortaliças, cap. 2, p. 55-73. 2005.

LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Doenças bacterianas. In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. (Ed.). *Doenças do Tomateiro*. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 2005, p.62-64.

LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Epidemiologia e controle das bactérias das hortaliças. In: ZAMBOLIM, L., LOPES, C. A., PICANÇO, M. C., COSTA, H. (Ed.). *Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças*. Viçosa: UFV/DFP, p. 115-162, 2007.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, USA, v. 5, p. 105-129, 2001.

MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, Brasil, v. 23, n. 2, p. 237-243. 2000.

MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P.; DOW, M.; VERDIER, V.; BEER, S. V.; MACHADO, M. A.; TOTH, I.; SALMOND, G.; FOSTER, G. D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. v. 13, n. 6, p. 614-629, 2012.

MARANCA, G. Tomate: variedades, cultivo, pragas e doenças, comercialização. São Paulo: Nobel, 158 p. 1981.

MARCUZZO, L. L.; BECKER, W. F.; FERNANDES, C. F. Alguns aspectos epidemiológicos da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro na região de caçador/ SC. *Summa Phytopathol*. Botucatu, v. 35, n. 2, p. 132-135, 2009.

MARINGONI, A. C.; KUROSZAWA, C. Erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasil, v. 16, n. 2, p. 191-194, 1994.

MARTINEZ, J. L., FAJARDO, A., GARMENDIA, L., HERNANDEZ, A., LINARES, J. F., SOLANO, L. M., SÁNCHEZ, M. B. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Review*. v. 33, n. 1, p. 44-65, Nov, 2009.

MORTON, D.J. Comparison of three serological procedures for identifying *Xanthomonas vesicatoria* in pepper leaves. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 55, p. 421-424, 1965.

NEUMANN, M. G., GESSNER, F., CIONE, A. P. P., SARTORI, R. A., CAVALHEIRO, C. C. S. Interações entre corantes e argilas em suspensão aquosa. *Química Nova*. v. 23, n. 6, 2000.

QUEZADO-DUVAL, A.M.;CAMARGO, L.E.A. Raças de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana em tomate para processamento industrial no Brasil. *Horticultura Brasileira*, Brasília- DF, v.22, p.80–86, 2004.

PELEGRINO, A. C. Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de porfirinas e ftalocianinas derivadas de éter de coroa. 2007. 179f. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

PELEGRINO, A. C.; CAROLINA, M. M.; GOTARDO, F. A.; SIMIONI, A. R.; ASSIS, M. D.; TEDESCO, A. C. Photophysical properties of crowned porphyrins. *Photochemistry and Photobiology*. v. 81, n. 4, p. 771-776, 2005.

PERALTA, I. E.; KNAPP, S.; SPOONER, D.M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Report on Tomato Genetics Cooperative*, Ithaca, v. 56, p.6-12, 2006.

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

PHOENIX, D. A., SAYED, Z., HUSSAIN, S., HARRIS, F., WAINWRIGHT, M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, UK, v. 39, n. 1, p. 17-22, 2003.

PINTON, P. C., ROSSI, M. T., SALA, R., VENTURINI, M. Photodynamic Antifungal Chemotherapy. *Photochemistry and Photobiology*, USA, v. 88, n. 3, p. 512-522, 2012.

QUINTERO, B.; MIRANDA, M. A. Mechanisms of photosensitization induced by drugs: A general survey. *Ars Pharmaceutica*, Granada, Espanha, v. 41, n. 1, p. 27-46, 2000.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: *impacto sobre a saúde humana*. *Revista Liberato*. Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.

RIBEIRO, J., FLORES, A., MESQUITA, R., NICOLA, J., NICOLA. Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer. *Physicae*, Campinas, 5, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.ifi.unicamp.br/physicae/ojs-2.1.1/index.php/physicae/article/view/144>>. Acesso em: 06 Mar. 2012.

ROBBS, C.F.A. “Mancha bacteriana” do pimentão (*Capsicum annuum* L.). *Agricultura e Pecuária*, Rio de Janeiro, n.25, p.22, 1953.

RODRIGUES NETO, J. Doenças bacterianas do tomateiro. In: SINIGAGLIA, C.; RODRIGUES NETO, J.; COLLARICIO, A.; VICENTE, M.; GROppo, G.; GRAVENA, S.; LEITE, D. (Ed.). *Manejo Integrado de Pragas e Doenças do Tomateiro*. v.6, São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 66 p., 2000.

ROMEIRO, R. S. *Fundamentos de bacteriologia de plantas*. Viçosa: Imprensa Universitária-UFV, 50p., 1988.

ROMEIRO, R. S. *Bactérias Fitopatogênicas*. 2.ed. Viçosa: UFV, 417p., 2005.

SAYED, Z., HARRIS, F., PHOENIX, D.A. A study on the bacterial photo-toxicity of phenothiazinium based photosensitizers. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 43, n. 3. p. 367-372, 2005.

SESSLER, J. L., KARNAS, E., SEDENBERG, E. Porphyrins and expanded porphyrins as receptors. *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*. V. 8, p. 1-29, 2012.

SETÚBAL, C. A. Procura por novos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica. 2007. 101f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SILVA, A. M. S.; CARMO, M. G. F.; OLIVARES, F. L.; PEREIRA, A. J. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatória* e efeitos sobre a semente. *Fitopatologia Brasileira*. Brasil, v. 27, n. 6, p. 586-593, 2002.

SIMPLICIO, F. I., MAIONCHI, F., HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química nova*, v. 25, n. 5. p. 801-807, 2002.

SMIJS, T. G. M., PAVEL, S. The susceptibility of dermatophytes to photodynamic treatment with special focus on *Trichophyton rubrum*. *Fotoquímica e Fotobiologia*. v. 87, n. 1, p. 2-13, 2010.

SINGH, P.; GOYAL, G. K. Dietary lycopene: its properties and anticarcinogenic effects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. v. 7, n. 3, p. 255-270, 2008.

SOARES, R. R DA S. Estudo das propriedades da Clorofila *a* e da Feofitina *a* visando a Terapia Fotodinâmica. 2006. 92f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

STALL, R.E.; JONES, J.B.; MINSAVAGE, G.V. Durability of resistance in tomato and pepper to Xanthomonads causing bacterial spot. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.47, p.265:284, 2009.

STERNBERG, E. D., DOLPHIN, D. Second Generation Photodynamic Agents: A Review. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v. 11, n. 5, p. 233-241, 1993.

SVENSATER, G., WELIN, J., WILKINS, J. C., BEIGHTON, D., HAMILTON, I. R. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*. v. 205, n. 1, p. 139-146, 2001.

SZEIMMIES, R., DRAGER, J., ALBES, C., LANDTHALER, M. History of photodynamic therapy in dermatology. *Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology*, v. 2, p. 3-15, 2001.

TANAKA, M., KINOSHITA, M. YOSHIHARA, Y., SHINOMIYA, N., SEKI, S., NEMOTO, K., HIRAYAMA, T., DAI, T., HUANG, L., HAMBLIN, M. R., MORIMOTO, Y.

Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils. *Photochemistry and Photobiology*, v. 88, n. 1, p. 227-232, 2012.

TARDIVO, J. P., GIGLIO, A. D., OLIVEIRA, C. S., GABRIELLI, D. S., JUNQUEIRA, H. C., TABA, D. B., SEVERINO, D., TURCHIELLO, R. F., BAPTISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basics mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.

VAKILL, N.G. Importance of wounds in bacterial spot (*Xanthomonas vesicatoria*) of tomatoes in the field. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 57, p.1099:1103, 1967.

VAUTERIN, L.; RADEMAKER, J.; SWINGS, J. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.90, p. 677:682, 2000.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparasion of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 29, n. 2, p. 165-173, 2001.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; USACHEV, Y. M.; SIEVERT, C. E.; BIEL, M. A. Interaction of the photobactericides Methylene Blue and Toluidine Blue with a fluorophore in *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Lasers in Sugery and Medicine*, v. 40, n. 1, p. 55-61, 2008.

ZOLFAGHARI, P. S., PACKER, S., SINGER, M., NAIR, S. P., BENNETT, J., STREET, C., WILSON, M. *In vivo* killing of *Staphylococcus aureus* using a light- activated antimicrobial agent. *BMC Microbiology*, v. 9, n. 27, p. 1-8., 2009.

ZOLLINGER, H. *Color Chemistry: Syntesis, Properties, and Applications os Organic Dyes and Pigments*. 3. ed. Zurich: VHCA e WILEY_VCH, 2003. 624p. (p 140-143).

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D. A.; MARLAND, J.; WAREING, D. R. A.; BOLTON, F. J. A study of photobactericidal activity in the phenotizinium series. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 75-80, 1997.

WAINWRIGHT, M., AMARAL, L. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. *Tropical Medicine & International Health*. v. 10, n. 6, p. 501-511, 2005.

WARNOCK, S. J. Natural habitats of *Lycopersicon* species. *HortScience*, v. 26, n. 5, p. 466-471, 1991.

7. PROPOSTA DE PESQUISAS FUTURAS

Trabalhos futuros poderiam, depois de efetuar o tratamento das sementes, acompanhar o crescimento da planta, bem como avaliar a produtividade e a qualidade dos frutos.

Tratar as sementes utilizando outros fotossensibilizadores e outras fontes de irradiação, em especial uma formulação que possa ser eficiente quando irradiada com luz branca ou mesmo usando a luz solar, a fim de simplificar o tratamento em condição de campo.

É possível, através de técnicas espectrofotométricas, avaliar e quantificar a formação de complexos de AT e lipopolissacarídeos presentes especialmente na inativação fotodinâmica de bactérias gram-negativas.

Os corantes testados nesse trabalho foram capazes de melhorar a germinação das sementes, podendo ser usados na quebra de dormência de sementes. Os experimentos poderiam ser efetuados sobre diversas sementes.

Por fim, outras sementes poderiam ser tratadas com o método desenvolvido nesse trabalho, com a finalidade de avaliar a eficiência do método sobre diferentes sementes e sobre diferentes tipos de organismos fitopatogênicos.