

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA

MARIANA GONÇALVES BORGES

TERAPIA FOTODINÂMICA NO CONTROLE DE *Pantoea ananatis in vitro*

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

UBERLÂNDIA – MG
NOVEMBRO 2018

MARIANA GONÇALVES BORGES

TERAPIA FOTODINÂMICA NO CONTROLE DE *Pantoea ananatis in vitro*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Agronomia,
da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de
Engenheira Agrônoma.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nilvanira Donizete Tebaldi

UBERLÂNDIA – MG
NOVEMBRO 2018

MARIANA GONÇALVES BORGES

TERAPIA FOTODINÂMICA NO CONTROLE DE *Pantoea ananatis in vitro*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Agronomia,
da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de
Engenheira Agrônoma.

Aprovado pela Banca Examinadora em 27 de novembro de 2018.

Eng^a Agron. Natalia Silva Oliveira - UFU

Eng^a Agron. Fabiana Silva Fraga - UFU

Prof^a. Dr^a. Nilvanira Donizete Tebaldi

Orientadora

RESUMO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) compreende todas as regiões do Brasil e a mancha branca do milho, causada pela bactéria *Pantoea ananatis* é uma das principais doenças foliares da cultura, reduzindo a sua produtividade. Não há produtos eficientes para o controle da doença e métodos alternativos devem ser avaliados. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de diferentes concentrações do corante azul de Metileno na inativação fotodinâmica da suspensão bacteriana de *Pantoea ananatis in vitro*. A suspensão bacteriana de $7,49 \times 10^7$ UFC/ml de *Pantoea ananatis* foi tratada com o corante Azul de Metileno, nas concentrações 25, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, na presença e ausência de radiação, avaliando-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC). O corante Azul de Metileno nas concentrações 100 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente, quando submetidos à irradiação foram eficazes na inibição do crescimento de *Pantoea ananatis in vitro*.

Palavras-chave: Azul de Metileno, Mancha branca, *Zea mays*.

ABSTRACT

Corn crops (*Zea mays* L.) are spreaded all over Brazil and the maize white spot (MWS) which etiological agent is *Pantoea ananatis* is one of the main foliar diseases of the crop, reducing its productivity. There are no efficient products for the control of this disease and alternative methods should be evaluated. The aim of the present work was to evaluate the efficacy of different concentrations of the Methylene Blue dye in the photodynamic inactivation of the bacterial suspension of *Pantoea ananatis* in vitro. The bacterial suspension of 7.49×10^7 CFU/ml of *Pantoea ananatis* was treated with Methylene blue dye, in three different concentrations 25, 50 and $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, each in the presence or absence of radiation, evaluating the number of colonies forming units (CFU). The Methylene Blue dye at concentrations of 50 and $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ respectively, when subjected to irradiation were effective in inhibiting the growth of *Pantoea ananatis* in vitro.

Keywords: Methylene Blue, Maize white spot, *Zea mays*.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
2- REVISÃO DE LITERATURA	Erro! Indicador não definido.
3- MATERIAL E MÉTODOS	4
3.1 Obtenção do inóculo e preparo da suspensão bacteriana	4
3.2 Terapia fotodinâmica no controle de <i>Pantoea</i> in vitro	5
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	6
4.1 Terapia fotodinâmica no controle de <i>Pantoea ananatis</i> in vitro	6
5. CONCLUSÕES	8
REFERÊNCIAS	9

1- INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) tem grande importância no cenário brasileiro, compreendendo todas as regiões do país. O milho deverá ter uma produção estimada de aproximadamente 90 milhões de toneladas, distribuídas entre primeira e segunda safras, em 2018/19 (CONAB, 2018).

A produção intensa da cultura do milho exige que sejam feitas semeaduras antecipadas sob irrigação, em primeira e segunda safra (PEREIRA et al., 2005). Com isso, houve uma modificação na dinâmica populacional dos patógenos que prejudicam a cultura do milho, tendo um aumento na incidência e na severidade de doenças nas regiões produtoras dessa cultura (LANZA, 2009).

A mancha branca, causada pela bactéria *Pantoea ananatis* (Paccola-Meirelles et al., 2001) é considerada, atualmente, uma das principais doenças foliares da cultura do milho no Brasil, estando presente em, praticamente, todas as regiões produtoras (COSTA et al., 2010). Folhas com 10 a 20% de severidade da doença apresentam uma redução na taxa fotossintética líquida em torno de 40%, em cultivares suscetíveis, podendo reduzir a produção de grãos em até 60% (GODOY et al., 2001). Os sintomas iniciam-se pelo aparecimento de lesões foliares aquosas com formato circular, do tipo anasarca, de coloração verde-claro que depois se tornam necróticas de cor palha. Em ataques mais severos há coalescência de lesões (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997).

Nos plantios tardios de milho as condições ambientais são favoráveis para o rápido desenvolvimento da doença e por isso o uso de cultivares resistentes e a aplicação de defensivos químicos são indicados para o controle da doença (COSTA et al., 2010). Embora saiba-se que o aumento da resistência das bactérias às drogas antibióticas gera a necessidade de desenvolver novos meios bacteriostáticos e bactericidas que colaborem com a terapêutica de indivíduos infectados e que por isso métodos alternativos de controle ainda devem ser avaliados (BENVINDO et al, 2008).

A terapia fotodinâmica consiste na utilização de corantes fotossensíveis que absorvem luz, de comprimento de onda específico, na presença de oxigênio molecular, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio, citotóxicas, capazes de promover a morte celular por necrose ou apoptose (PELEGRINO et al., 2005; MACHADO, 2000). Vários tipos de fotossensibilizadores estão sendo avaliados com diferentes composições e propriedades de absorção de luz, como o Azul de Metileno

que tem apresentando resultados satisfatórios frente à inativação dos microrganismos comparados aos outros agentes fotossensibilizadores (COSTA et al., 2013)

Visando a inovação, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de diferentes concentrações do corante Azul de Metileno sob irradiação na inativação e na inibição do crescimento de *Pantoea ananatis in vitro*.

2- REVISÃO DE LITERATURA

A produção mundial de milho nos últimos vinte anos teve aumento significativo, com uma produção estimada para a safra 2018/19 de aproximadamente 90 milhões de toneladas (CONAB, 2018).

A cultura do milho no Brasil é de grande importância para o agronegócio nacional, além de ser a base de sustentação para a pequena propriedade, devendo ser interpretada sob a ótica da cadeia produtiva ou dos sistemas agroindustriais, uma vez que o milho é insumo para uma centena de produtos (DUETET al., 2008).

O milho é usado em grande escala tanto pela produção de alimento animal (cerca de 60% a 80%) quanto para exportação e consumo humano (OLIVEIRA; BEZERRA, 2013).

A mancha branca do milho causada pela bactéria *P. ananatis* (Paccola-Meirelles et al., 2001), se desenvolve bem em condições de alta precipitação, alta umidade relativa e baixas temperaturas noturnas (14°C) do ar. Quanto maior a população bacteriana, maior o número de lesões levando a prejuízos na produção de até 60% (CASELA, et al., 2006).

A mancha branca do milho é caracterizada pelo aparecimento de manchas cloróticas, aquosas do tipo anasarca no limbo foliar que ao se desenvolverem podem adquirir coloração palha (PEDRO et al., 2010).

A *Pantoea ananatis* é uma bactéria Gram-negativa, não esporulante, anaeróbia facultativa, formadora de colônias com crescimento mucoso e de coloração amarelo brilhante quando em meio de cultura.

Pinto & Fernandes (1995) avaliaram a ação de vários fungicidas no controle da doença. Dentre os produtos avaliados, o oxiclreto de cobre e o Mancozeb mostraram-se eficientes; entretanto o oxiclreto de cobre apresentou efeito fitotóxico.

Para o controle da mancha branca estão registrados junto ao Ministério da Agricultura produtos químicos pertencentes a grupos como: triazóis, estrobilurinas, benzimidazóis, geralmente eficientes no controle de doenças fúngicas. No entanto, há necessidade de busca por novas medidas de controle. (PEDRO et al, 2012).

Por meio do processo chamado inativação fotodinâmica, micro-organismos podem ser mortos mediante a reações de fotossensibilização. Os mecanismos de ação que executam a inativação fotodinâmica de patógenos não é parecido com os mecanismos

dos antibióticos, pois um mesmo fotossensibilizador pode ser usado contra vários microorganismos de naturezas diferentes. As reações de fotossensibilização produzem espécies reativas de oxigênio, que têm a capacidade de oxidar compostos orgânicos insaturados, como os lipídeos, os quais compõem a membrana celular das bactérias (PERUSSI, 2007). A inativação fotodinâmica por sua vez, é eficiente na redução dos microrganismos apresentando-se como uma terapia alternativa confiável para o tratamento antimicrobiano convencional (PERUSSI, 2007). Já existem publicações a respeito da inativação fotodinâmica desde o início do século XX, porém, somente no final de 1980 aplicou-se efetivamente essa tecnologia na saúde humana; primeiramente no tratamento de tumores malignos superficiais e, em seguida, no tratamento de infecções locais, fúngicas e bacterianas (COSTA et al, 2013).

Em trabalhos recentes foi mostrado que a *H. pylori* acumula naturalmente porfirina suficiente para permitir fotoinativação com luz azul. Em um teste clínico preliminar em 13 pacientes usando-se administração oral de ácido 5-aminolevilínico (ALA) e iluminação da porção gástrica após 45 min com um laser azul acoplado a um endoscópio. A erradicação dessa bactéria por PDI foi constatada através de biópsia. (WILDER-SMITH et al, 2002)

De modo similar a muitas células de mamíferos, a maioria das bactérias usam o caminho biossintético do heme para produzir porfirinas a partir do precursor ALA. A acne é causada pelo crescimento da *P. acnes* nas glândulas sebáceas e essas bactérias acumulam porfirinas que fluorescem no vermelho; essa propriedade tem sido usada como base para o tratamento fototerápico da acne (MEFFERT et al, 1990). PDI com aplicação tópica de ALA e aplicação de luz vermelha foi testada em 22 pacientes com *Acne vulgaris* nas costas. Foi observada a eliminação da acne inflamatória que persistiu por pelo menos 20 semanas (HONGCHARU et al, 2000).

3- MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Uberlândia, no período de março a junho de 2017.

3.1 Obtenção do inóculo e preparo da suspensão bacteriana

Os isolados UFU B13 de *Pantoea ananatis*, proveniente de Planaltina de Goiás, GO, pertencente à coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da UFU foi cultivado em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 48h.

A suspensão bacteriana foi preparada em solução de NaCl 0,45%, e ajustada em espectrofotômetro para $OD_{550} = 0,11$ correspondendo a, aproximadamente, 1×10^8 UFC mL^{-1} .

3.2 Terapia fotodinâmica no controle de *Pantoea ananatis in vitro*

Para a inativação da suspensão bacteriana utilizou-se o corante azul de Metileno em diferentes concentrações, sendo submetido à irradiação ou não (escuro).

O corante Azul de Metileno (AM) foi preparado nas concentrações 25, 50 e 100 $\mu mol L^{-1}$, em solução de NaCl (0,45%) e autoclavados, por 30 min a 120 °C. Como testemunha foi utilizada a solução de NaCl (0,45%).

Em microtubos colocou-se 100 μL da suspensão bacteriana e 900 μL do corante para cada concentração. Todos os microtubos foram recobertos com papel alumínio para a proteção contra a luminosidade e incubados em estufa a 28 °C por 20 min. Posteriormente, parte dos microtubos foram irradiados a 5 cm de distância da fonte de iluminação no equipamento AMS-II (Sistema de LED de alta potência, emissão 652 nm) por 20 minutos. Os demais microtubos foram mantidos no escuro em temperatura ambiente.

Em seguida a suspensão bacteriana dos tratamentos foram diluídas em série (10^{-2} a 10^{-7}) e cultivada em meio de cultura 523, em placa de Petri. As placas foram incubadas a 28° C por 4 dias, avaliando-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC mL^{-1}) pela contagem de colônias formadas.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento de blocos inteiramente casualizados, com três repetições e em um arranjo fatorial 4 x 2 x 3 (concentrações x luminosidade x repetições).

As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, as análises foram realizadas através do programa estatístico SISVAR versão 5.30 (FERREIRA, 2010).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Terapia fotodinâmica no controle de *Pantoea ananatis in vitro*

O tratamento da suspensão bacteriana nas três concentrações (25, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) do corante azul de metileno (AM), quando não irradiado (escuro) (Tabela 1) proporcionou o crescimento da bactéria em meio de cultura, ou seja, estes tratamentos não erradicaram a bactéria. No entanto, quando a suspensão bacteriana foi tratada o corante AM e irradiada nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ houve eliminação total das células bacterianas. Embora para a concentração de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM tenha ocorrido o crescimento da bactéria ($1,1 \times 10^6$) não diferiu significativamente do número de UFC da Testemunha ($7,2 \times 10^6$).

Tabela 1. Diferentes concentrações de azul de metileno, irradiados ou não, na erradicação da bactéria *Pantoea ananatis in vitro*.

Azul de Metileno (μM)	Irradiado	Não irradiado
Testemunha	$7,2 \times 10^6$ b A	$7,34 \times 10^7$ b B
25	$1,1 \times 10^6$ ab A	$4,21 \times 10^7$ a B
50	0,0 a A	$4,14 \times 10^7$ a B
100	0,0 a A	$4,33 \times 10^7$ a B

CV (%) 10,05

Letras minúsculas na linha

Letras maiúsculas na coluna

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Hussain et al. (2006) demonstraram a eficácia do corante AM contra *Escherichia coli*, embora não tenham determinado os mecanismos de ação do corante de maneira precisa. Já o experimento de De Paula (2010) constatou que o corante AM, em concentrações em torno de 50 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, foi capaz de inibir significativamente o crescimento de *Staphylococcus aureus in vitro*.

Longo e Azevedo (2010) encontraram resultados semelhantes a este trabalho, em estudos com *E. coli*, o tratamento com AM isolado nas concentrações 25 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ não apresentou efeito bactericida. Em contrapartida, a combinação deste corante com irradiação a laser promoveu redução significativa do número de colônias. Tal resultado mostra que para o sucesso da terapia fotodinâmica é necessário a junção dos fatores: luz e agente fotossensibilizador. Os corantes fotossensíveis absorvem a luz em um específico comprimento de onda, o oxigênio presente é transformado para o estado excitado, reagindo com o substrato local, formando radicais citotóxicos, reagindo com a parede celular, ácidos nucleicos, peptídeos, lipídeos, proteínas, etc. (DONNELLY et al., 2008).

Corantes fotossensíveis absorvem luz em um comprimento de onda específico na presença de oxigênio resultando em espécies reativas de oxigênio, que são citotóxicas e capazes de promover a morte celular por apoptose ou necrose (PELEGRINO et al., 2005; MACHADO, 2000). Esses corantes possuem a capacidade de passar pela membrana celular por canais de proteínas presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas (USACHEVA et al., 2001). O corante AM possui afinidade por proteínas da parede celular e da membrana bacteriana (USACHEVA et al., 2008), sendo assim, esse corante é considerado um excelente destruidor da membrana pela sua ação fotodinâmica (USACHEVA et al., 2001).

O crescimento da bactéria *Pantoea ananatis* em meio de cultura, após os tratamentos com o corante AM, nas diferentes concentrações 25, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, quando irradiado ou no escuro, pode ser observado na Figura 1. É possível perceber que em todos os tratamentos que não foram irradiados, houve o crescimento normal da bactéria. Enquanto nos tratamentos que foram irradiados, houve redução gradativa do número de UFC, no sentido que aumenta a concentração do corante, de forma que no tratamento com corante na concentração de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ houve diminuição significativa do crescimento de células bacterianas mas foram nos tratamentos com corante nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ que houve a erradicação total da bactéria.

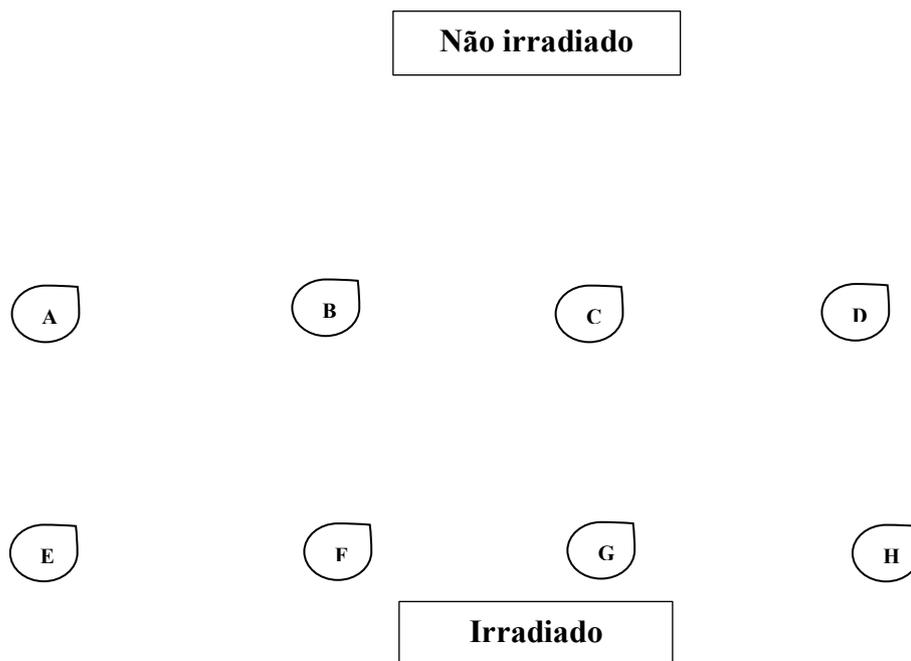
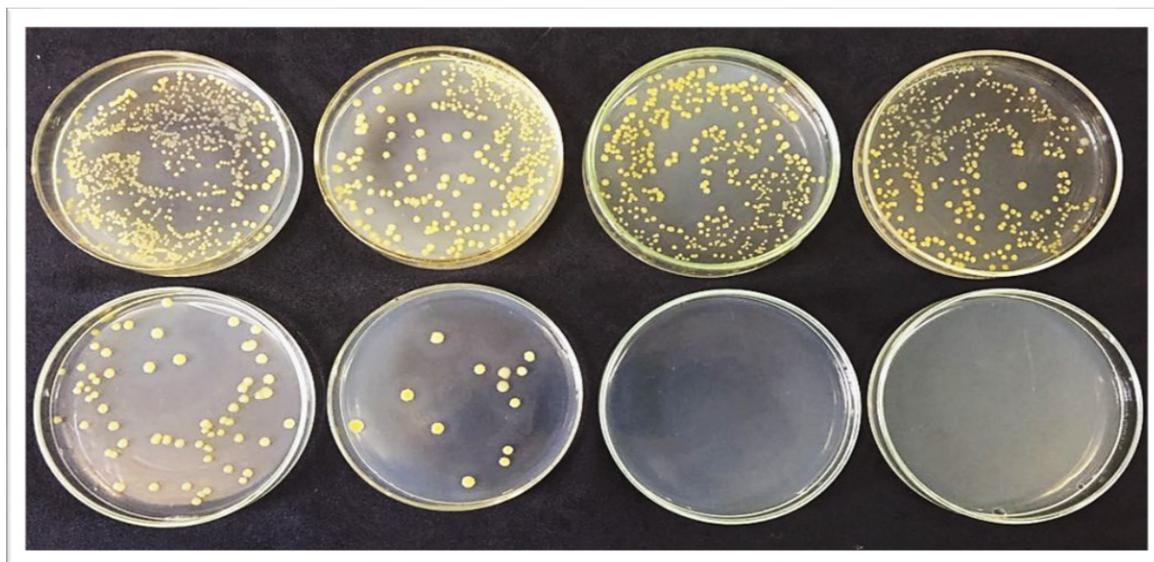


Figura 1. Erradicação de *Pantoea ananatis in vitro*, tratadas com azul de metileno (AM) não irradiado, testemunha (A), AM 25 uM (B), AM 50 uM (C), AM100 uM (D). Irradiado, testemunha (E), AM 25 uM (F), AM 50 uM (G), AM100 uM (H).



Sendo assim, o corante azul de metileno quando irradiado apresenta como um método eficaz e alternativo no controle de fitobactérias. Sendo um método inovador e não utilizando nenhum produto tóxico ao ser humano e animais, importante para o desenvolvimento de uma agricultura mais consciente, ambientalmente correta e socialmente colaborativa.

5. CONCLUSÃO

O corante Azul de Metileno, nas concentrações 100, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, quando irradiados foram eficazes em inibir o crescimento de *Pantoea ananatis in vitro*.

REFERÊNCIAS

- BENVINDO, R. G.; BRAUN, G.; CARVALHO, A. R. B., GLADSON R. F. **Efeitos da terapia fotodinâmica e de uma única aplicação de laser de baixa potência em bactérias in vitro.** *Fisioter. Pesqui.* São Paulo, v. 15, n. 1, p. 53-57, 2008.
Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-29502008000100009&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 15 de outubro de 2018.
- CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho. Embrapa–Circular Técnica 83**, Embrapa, Sete Lagoas, MG, Brasil, 2006.
- CONAB, **Acomp. safra bras. Grãos - Safra 2018/19 - Segundo levantamento**, Brasília, Boletim Grãos, v. 6, p. 85, novembro 2018.
- COSTA, R. V. da; CASELA, C. R.; COTA, L. V. Doenças. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 6. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010.
- COSTA, A.S; LEITE P.P; PINTO J.G; FERREIRA–STRIXINO, J. **Terapia fotodinâmica na inativação de microrganismos.** Revisão de Literatura. Disponível em: http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2013/anais/arquivos/RE_0234_0490_01.pdf
Acessado: 09 de agosto de 2018
- 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.
- DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. **Antifungal Photodynamic Therapy.** *Microbiological Research*, Jena, v.163, p. 1-12, 2008
- DUETE, R. R. C.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C.; TRIVELIN, P. C. O. & AMBROSANO, E. J. **Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (15N) pelo milho em latossolo Vermelho.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 32, p. 161-171, 2008.
- FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho. Embrapa-Circular Técnica 26**, Embrapa, Sete Lagoas, p. 26-80, 1997.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR - Sistema de análise de variância.** Versão 5.3. Lavras MG: UFLA, 2010.
- GODOY, C. V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. **Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infectadas por *Phaeosphaeria maydis*.** *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 26, p. 209-215, 2001.
- HONGCHARU, W.; TAYLOR, C. R.; CHANG, Y.; AGHASSI, D.; SUTHAMJARIYA, K.; ANDERSON, R. R.; **J. Topical ALA-Photodynamic Therapy for the Treatment of Acne Vulgaris.** *Invest. Dermatol.* v.115, p.183, 2000.

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

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. **Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*.** Phytopathology, Saint Paul, v. 60, p. 969-976. 1970.

LANZA FE (2009) **Mancha branca do milho (*Pantoea ananatis*): variabilidade no patógeno e resistência genética no hospedeiro.** Projeto de Pesquisa. Universidade Federal de Viçosa Centro de Ciências Agrárias Departamento de Fitopatologia. Disponível em: <http://www.livrosgratis.com.br/arquivos_livros/cp100847.pdf>. Acessado: 28 julho 2014.

LONGO, J.P.F.; AZEVEDO, R.B. **Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas.** Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica, Curitiba, v.6, p. 249-257, 2010.

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

MEFFERT, H.; GAUNITZ, K.; GUTEWORT, T.; AMLONG, U. J.; **Therapy of acne with visible light. Decreased irradiation time by using a blue-light high-energy lamp.** *Dematol. Monatsschr.* v.176, p.597, 1990.

OLIVEIRA, M.N.; BEZERRA, R. **Cultura do Milho.** In: XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – Jepex – UFRPE: Recife, 2013.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; FERREIRA, A.S.; MEIRELLES, W.F.; MARRIEL, I.E.; CASELA, C.R. **Detection of a bacterium associated with a leafspot disease of maize in Brazil.** Journal of Phytopatology, Berlim, v. 149, n. 5, p. 275-279, 2001.

PEDRO, E.S.; GONÇALVES, R.M.; MEIRELLES, W.F.; REGINA, M.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. **Avaliação de diferentes produtos no controle da mancha branca do milho.** In: XXVIII CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, Goiânia, 2010.

PEDRO, E. dos S.; GONÇALVES, R. M.; MEIRELLES, W. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. **Produtos de diferentes grupos químicos no controle da mancha branca do milho.** Seminário de Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, p. 2981-2984, 2012.

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, Edição 4, Oxford, v. 81, p. 771-776, 2005.

PEREIRA, O. A. P.; CARVALHO, R. V.; CAMARGO, L.; **Doenças do milho.** In: KIMAT, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.(Ed.). Manual de Fitopatologia. São Paulo: Ceres, v.2, p.477-488, 2005.

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

PINTO, N.F.J.A.; FERNANDES, F.T. **Avaliação de fungicidas no controle da mancha foliar de milho causada por *Phyllosticta* sp. (*Phaeosphaeria maydis*).** Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.20, supl., p.333, 1995.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. **Comparasion of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gramnegative microorganisms.** Lasers in Surgery and Medicine, New York, v. 29, 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 46 fluorophore in *Pseudomonas aeruginosa* cells.** Lasers in Sugery and Medicine, New York, v. 40, p. 55-61, 2008.

WILDER-SMITH, C. H.; WILDER-SMITH, P.; GROSJEAN, P.; VAN DEN BERGH, H.; WOODTLI, A.; MONNIER, P.; DORTA, G.; MEISTER, F.; WAGNIERES, G.; **Photoeradication of *Helicobacter pylori* using 5-aminolevulinic acid: preliminary human studies.** *Lasers Surg. Med.*, v.31, p.18, 2002.