

Inativação fotodinâmica de conídios de *Colletotrichum graminicola*

Camila Chevonica Vandresen¹, Alan Guilherme Gonçalves², Miguel Daniel Nosedá³, Maria Eugenia Rabello Duarte⁴, Diogo Ricardo Ducatti⁵ e Sandra Mara Woranovicz Barreira⁶

^{1,2,3,4,5,6} Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. ¹camilacvandresen@gmail.com, ²halagg@hotmail.com, ³mdn@ufpr.br, ⁴nosedaeu@ufpr.br, ⁵ducatti@ufpr.br e ⁶sandra@ufpr.br.

RESUMO – A inativação fotodinâmica (PDI) consiste em uma técnica que apresenta a associação de intensidade luminosa com um fotossensibilizador na presença de oxigênio. Como fotossensibilizadores, as porfirinas vêm sendo utilizadas para inativação de diversos micro-organismos, inclusive os fungos, sem ocasionar resistência microbiana. *Colletotrichum graminicola* é um fitopatógeno, agente causal da antracnose foliar e do colmo em milho (*Zea mays* L.). O micro-organismo apresenta elevada capacidade de sobrevivência e a resistência aos fungicidas empregados atualmente está descrita, dificultando o controle da enfermidade. Nesse contexto, o presente estudo objetiva avaliar a propriedade fotodinâmica inativadora de um derivado porfirínico catiônico sobre os conídios de *Colletotrichum graminicola*. Foi utilizada uma suspensão de conídios do micro-organismo padronizada em 10⁴ conídios/mL, tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina (tetra-Py⁺) como fotossensibilizador em concentrações de 5, 25, 50 e 75 micromol e irradiação com intensidade de 100 mW/cm² empregada por um período de 30 minutos. Os resultados obtidos evidenciam efetividade na inativação de conídios de *C. graminicola* empregando Tetra-Py⁺ como fotossensibilizador. A inativação aliada à ausência de toxicidade intrínseca representa uma importante alternativa para o controle da antracnose, contribuindo nos âmbitos econômico e de saúde pública relacionados ao cultivo de milho no Brasil.

Palavras-chave: Antracnose, fotossensibilizador, derivados porfirínicos.

Introdução

As metodologias usualmente empregadas para inativação dos micro-organismos não se apresentam inertes ao meio ambiente e nem mesmo são totalmente eficazes. A busca por novos procedimentos com características bem estabelecidas de eficácia associadas à inocuidade ao meio ambiente tem sido constante.

Nesse contexto, a inativação fotodinâmica (PDI) consiste em uma importante ferramenta a ser utilizada. Segundo Donnelly *et al.* (2008), o processo é composto pela interação entre uma molécula fotossensibilizadora e luz em comprimento de onda específico, com a promoção da molécula para um estado excitado que, na presença de oxigênio, culmina na geração de espécies reativas que determinam a destruição e morte celular. A toxicidade gerada, porém, é seletiva, visto que os maiores danos gerados para as células são evidenciados quando há exposição à luz, o que contribui para a ausência de indução de resistência nos micro-organismos expostos.

Dentre os compostos fotossensibilizadores investigados atualmente se encontram os

derivados porfirínicos, que apresentam em sua estrutura básica um macrociclo composto por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por ligações metínicas. Modificações moleculares realizadas nessa estrutura básica, tais como introdução de grupos hidrofílicos ou inserção de cargas, geram os derivados.

De acordo com Cormick *et al.* (2009) resultados satisfatórios têm sido obtidos especialmente quando há presença de cargas positivas na estrutura do fotossensibilizador.

Atualmente, inúmeros estudos estão sendo realizados com o intuito de avaliar a efetividade fotoinativadora de diversos derivados porfirínicos, porém, tais estudos são escassos quando se trata de fitopatógenos.

Colletotrichum graminicola é um fungo imperfeito, fitopatógeno, agente causal da antracnose e se relaciona diretamente às doenças do colmo e foliares do milho (*Zea mays*) (COSTA *et al.*, 2010). A incidência de tais enfermidades pode ser superior a 70% e perdas na produtividade permanecem entre 18 e 50%.

Os tratamentos atuais utilizados consistem em novas técnicas de cultivo e utilização de agrotóxicos, porém, esses não são totalmente eficazes. A dificuldade no controle da doença reside no fato do patógeno apresentar elevada capacidade de sobrevivência em restos de cultura associada à resistência atualmente descrita do micro-organismo a fungicidas quinolínicos, comumente utilizados na agricultura.

O emprego de tais compostos químicos gera custos adicionais atribuídos aos efeitos negativos observados no âmbito da saúde pública.

O Brasil apresenta elevada produtividade de milho. Para consumo interno, o grão é transformado em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose e flocos para cereais matinais. A produção é crescente a cada ano e a exportação, cada vez mais importante. As perdas de produtividade ocasionadas refletem diretamente na economia brasileira.

O desenvolvimento de métodos para controle de antracnose que se apresentem eficazes e inócuos ao meio ambiente e à saúde humana e animal é um importante aspecto a ser considerado. Sendo assim, a avaliação da atividade fotodinâmica inativadora dos derivados porfirínicos em relação aos esporos do fungo *Colletotrichum graminicola* pode se tornar uma ferramenta a ser utilizada para o controle da antracnose do milho em regiões brasileiras, bem como para auxiliar a agricultura nos aspectos econômico, social e de saúde pública.

Material e Métodos

O micro-organismo foi gentilmente cedido pela Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas,

Minas Gerais, Brasil. O cultivo foi realizado em meio de cultura Agar farinha de aveia e incubação em estufa BOD à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 5 dias em ciclos de doze horas de luminosidade. Para conservação dos conídios foi empregada a técnica de congelamento a -20°C em solução láctea 10%. O preparo da suspensão conidial foi realizado através de inundação de placas contendo o micro-organismo com solução de Tween 80 0,1% seguida da padronização em câmara de Neubauer a concentração de 10^4 conídios/mL. O composto tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina (tetra-Py⁺) foi obtido através de síntese química anteriormente realizada pelo grupo de pesquisa. Foi preparada uma solução estoque com concentração de 1 milimol em dimetilsulfóxido. Dessa solução, foram selecionados volumes da solução para resultar nas concentrações avaliadas no estudo: 5, 25, 50 e 75 micromol. A fonte luminosa utilizada foi proveniente da lâmpada Lumacare® com intensidade fixada em 100 mW/cm². Como grupos controle foram avaliadas duas condições: a suspensão conidial em contato apenas com intensidade luminosa (controle claro) e suspensão apenas na presença da porfirina em concentração de 100 micromol (controle escuro), as quais foram comparadas à uma suspensão diluída na ausência de ambos os componentes. Para os experimentos de inativação, foram empregadas placas para cultura de tecido contendo seis poços (TPP®) nas quais foram inseridos 100 microlitros da suspensão conidial, fotossensibilizador em volumes variáveis e PBS em quantidade suficiente para perfazer um volume final de 5 mililitros. A irradiação procedeu por um período de trinta minutos, sendo coletadas amostras nos períodos 0, 5, 10, 20 e 30 minutos, exceto para os controles, que foram realizados durante o período total sem coletas intermediárias. As coletas do meio reacional, em um volume de 100 microlitros foram distribuídas em duplicata para placas de Petri contendo meio de cultura Agar Sabouraud. A seguir, as placas foram incubadas em estufa BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 60 horas, em ciclos alternados de luminosidade (doze horas). Os resultados foram obtidos através da contagem do número de colônias de *C. graminicola* e posterior conversão a Unidades Formadoras de Colônia/mililitro (UFC/mL). Avaliação gráfica e estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa Prisma 5.0. Os ensaios foram realizados em dias alternados e em triplicata.

Resultados e Discussão

A figura 1 denota a aparência das colônias de *C. graminicola* após um período de 60 horas de incubação em estufa BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclos alternados de luminosidade (doze horas).

Os resultados obtidos em UFC/mL na triplicata encontram-se descritos na tabela 1.

A tabela 2 demonstra o período de irradiação necessário para redução significativa na viabilidade dos conídios de *C. graminicola*.

A estrutura química do composto Tetra-Py⁺ está representada na figura 2.

A figura 3 evidencia os gráficos com os resultados obtidos para a PDI realizada, incluindo a análise para os controles.

Houve redução na viabilidade de conídios do fitopatógeno no meio reacional após o procedimento da PDI, demonstrada pela redução das UFC/mL. Diferenças significativas foram observadas em tempos de irradiação distintos, fato dependente da concentração de fotossensibilizador. Para a menor concentração do composto, o tempo para redução significativa do micro-organismo foi superior quando relacionado às concentrações mais elevadas.

Nesse contexto, diferenças significativas foram evidenciadas apenas entre as concentrações 5 e 25 micromol, nas quais o período de irradiação necessário para inativação significativa do micro-organismo residiu em 66,7% e 16,7% do período total de irradiação, respectivamente. Para as demais concentrações de derivado porfirínico, 50 e 75 micromol, não foram evidenciadas alterações no padrão de efetividade demonstrado pela concentração de 25 micromol, comprovando a necessidade de pequenas concentrações do fotossensibilizador para a obtenção de um efeito satisfatório. As cargas positivas presentes na estrutura do derivado porfirínico facilitam a ligação à membrana conidial e a consequente internalização do composto pelo micro-organismo.

Os resultados obtidos corroboram com o princípio teórico da inativação fotodinâmica de micro-organismos. A captação do composto pelos conídios do fitopatógeno associada à irradiação por períodos variáveis de tempo ocasionam a inativação de *C. graminicola*, evidenciada pela redução no número de UFC/mL de suspensão quando comparada com o período inicial da irradiação. Os controles demonstram ausência de toxicidade da irradiação isoladamente, assim como do derivado porfirínico na ausência de qualquer fonte luminosa. A interação entre os três componentes - irradiação, fotossensibilizador e oxigênio - acarreta a geração de espécies reativas de oxigênio, que interagem com macromoléculas conidiais, resultando na inativação fúngica. Segundo Wainwright (1998), dentre as estruturas celulares atingidas na PDI se encontram peptídeos, lipídeos, ácidos nucleicos, entre outros. O dano é gerado especialmente por reações químicas de oxidação.

Atualmente, encontra-se bem estabelecida a variação na efetividade dos derivados

porfirínicos como fotossensibilizadores, a qual se relaciona diretamente à estrutura química e propriedades físico-químicas e fotofísicas dos compostos. Portanto, novos ensaios serão realizados empregando derivados estruturalmente semelhantes para avaliar a efetividade na inativação dos conídios de *C. graminicola* e estabelecer uma possível relação estrutural-atividade.

Conclusões

A PDI demonstrou ser efetiva para a inativação do micro-organismo em baixas concentrações de fotossensibilizador. A ausência de toxicidade intrínseca dos componentes, associada ao período curto de processamento das reações acarreta menor dano ao hospedeiro e ao meio ambiente. Tendo em vista a efetividade demonstrada pela técnica para inativação de *C. graminicola* empregando Tetra-Py⁺ como fotossensibilizador, essa pode ser direcionada para a avaliação *in vivo* de partes de milho acometidas por antracnose e consistir uma alternativa para a utilização de agrotóxicos no controle doença, denotando auxílio do ponto de vista econômico, social e de saúde pública, uma vez que a toxicidade é extremamente reduzida para os fotossensibilizadores, quando comparada àquela proveniente dos fungicidas.

Literatura Citada

CORMICK, M. P.; ALVAREZ, M. G.; ROVERA, M.; DURANTINI, E. N. Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* Sensitized by Tri- and Tetra-Cationic Porphyrin Derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 4, p. 1592-1599, 2009.

COSTA, R. V. D.; SILVA, D. D.; COTA, L. V.; PARREIRA, D. F.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Incidência de *Colletotrichum graminicola* em colmos de genótipos de milho. *Summa Phytopathologica*, v. 36, n. 2, p. 122-128, 2010.

DONNELLY, R.; MCCARRON, P.; TUNNEY, M. Antifungal Photodynamic Therapy. *Microbiological Research*, v. 163, n. 1, p. 1-12, 2008.

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



Figura 1. Colônias de *C. graminicola* em Ágar Sabouraud Dextrosado após 60 horas de incubação.

Tabela 1. Resultados pós-PDI em UFC/mL de *Colletotrichum graminicola* nos experimentos em triplicata

* 0	5 μ M			25 μ M			50 μ M			75 μ M		
0	5,45	4,78	5,45	5,28	5,40	5,41	5,34	5,41	5,34	5,38	5,43	5,41
5	5,41	4,78	5,41	--	--	--	--	--	--	--	--	--
10	4,30	4,90	4,78	--	--	--	--	--	--	--	--	--
20	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
30	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

*Tempo das coletas (minutos)

Tabela 2. Período de irradiação necessário para fotoinativação significativa de *Colletotrichum graminicola*

Concentração de TetraPy ⁺ (μ M)	Redução significativa de <i>C. graminicola</i> (minutos)
5	20
25	5
50	5
75	5

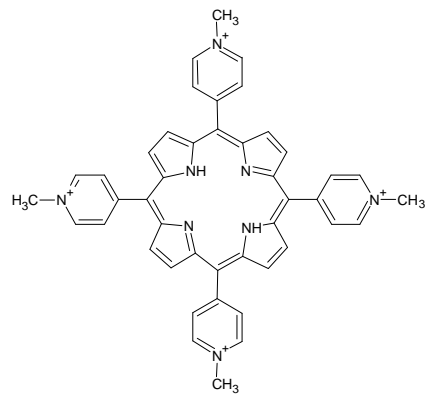
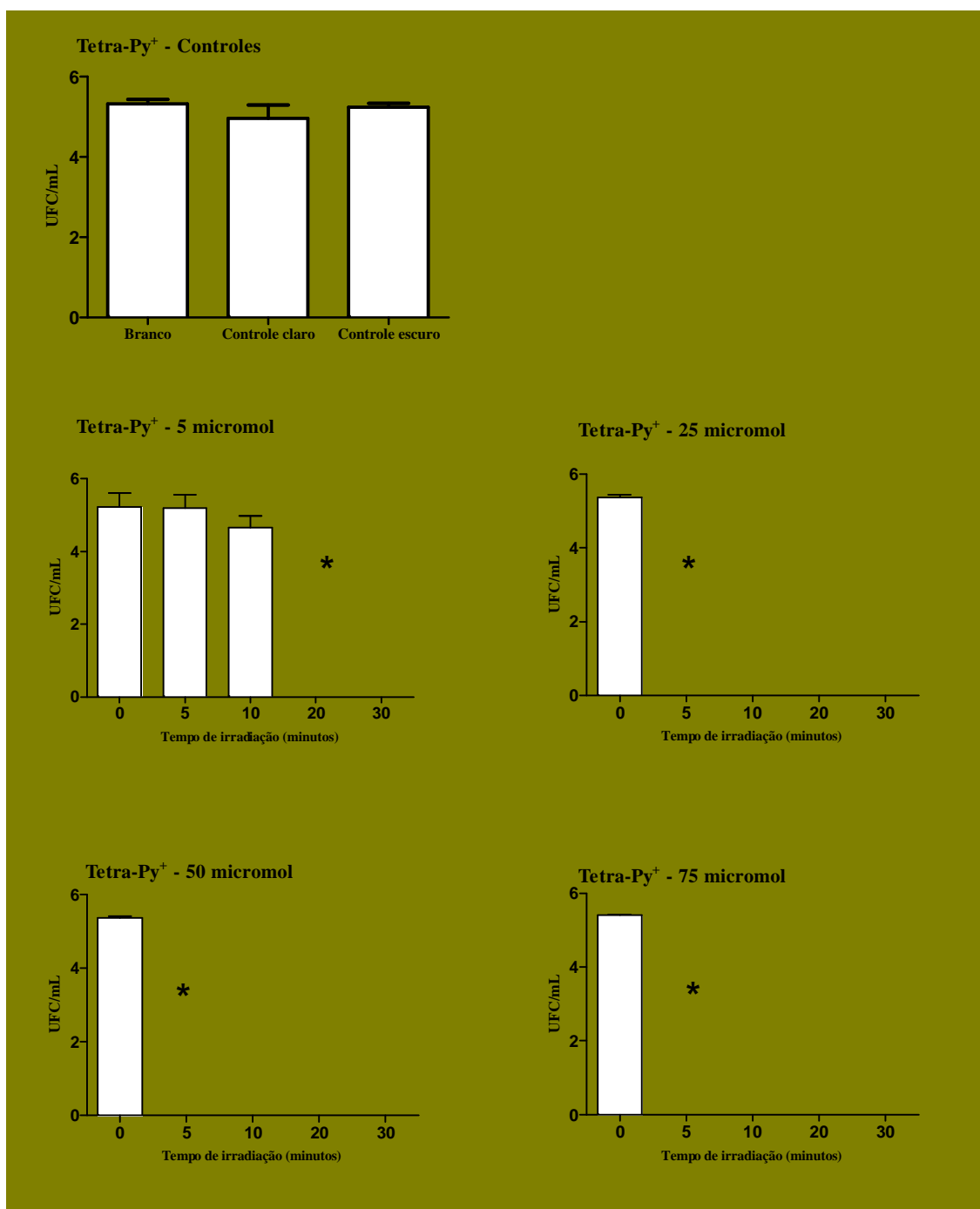


Figura 2. Estrutura química de Tetra-Py⁺



*Inativação significativa.

Figura 3. Resultados obtidos para a PDI e controles, expressos graficamente.