

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais

**MODELOS MATEMÁTICOS E ANÁLISE FRACTAL NA
INVESTIGAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE
MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS**

ALESSANDRO DA SILVA KALCK

BARRA DO GARÇAS - MT

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais

**MODELOS MATEMÁTICOS E ANÁLISE FRACTAL NA
INVESTIGAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE
MICROORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS**

ALESSANDRO DA SILVA KALCK

Orientadora: Prof. Dr^a. NARA CRISTINA DE SOUZA

Co-orientador: Prof. Dr. Josmary Rodrigues Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Mato Grosso para obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais.

BARRA DO GARÇAS - MT

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

K14m Kalck, Alessandro da Silva.
Modelos Matemáticos e Análise Fractal na Investigação da Inativação
Fotodinâmica de Microrganismos Fitopatogênicos / Alessandro da Silva
Kalck. -- 2017
viii, 72 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Nara Cristina de Souza.
Co-orientador: Josmary Rodrigues Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Campus
Universitário do Araguaia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de
Materiais, Barra do Garças, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Colletotrichum sp.. 2. Cephaleuros sp.. 3. Laranja de acridina. 4.
Velocidade de crescimento. 5. Processamento de imagens. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

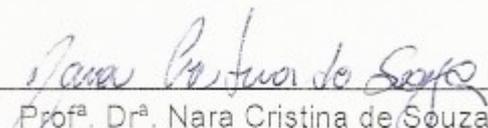
Título: MODELOS MATEMÁTICOS E ANÁLISE FRACTAL NA
INVESTIGAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE
MICROORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS

Autor: ALESSANDRO DA SILVA KALCK

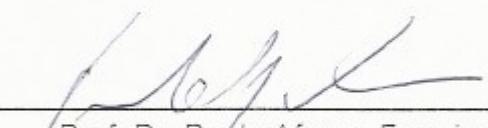
Orientador: Dr^a. NARA CRISTINA DE SOUZA

Aprovada em 24 de Março de 2017

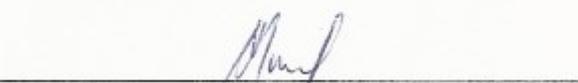
Comissão Examinadora:



Prof^a. Dr^a. Nara Cristina de Souza
UFMT/Barra do Garças



Prof. Dr. Paulo Afonso Ferreira
UFMT/Barra do Garças



Prof. Dr. Arian Paulo de Almeida Moraes
UFMT/Barra do Garças

“...Aprendi o segredo de viver contente em toda e qualquer situação, seja bem alimentado, seja com fome, tendo muito, ou passando necessidade”
“Tudo posso naquele que me fortalece” (Filipenses 4: 12-13)

Dedicatória:

*Aos meus pais, Sonia P. da Silva Kalck e Valdomiro Kalck.
A minha esposa Maria Fernanda, por tantos momentos que
passamos juntos.*

AGRADECIMENTOS

Meu maior agradecimento é a DEUS, por permitir que vencesse mais esta etapa e por tantas maravilhas que ele faz em minha vida.

Aos prezados orientadores Dr^a Nara C. de Souza e Dr. Josmary R. Silva, pela humildade, honestidade, compromisso e dedicação e por serem mais que professores, serem amigos... e falar nos dois, sem falar na pequena Alice é impossível... Agradeço a ela por trazer mais alegria e descontração para o GMN.

A minha amada esposa Maria Fernanda, por fazer acontecer tantas coisas boas em minha vida, pelo apoio nesse período, tantas coisas que passamos juntos... períodos difíceis, mas também tempos de imensa alegria... agradeço por você estar perto de mim, pois sem sua presença não seria capaz de ser o que sou...Obrigado por tudo.

A Minha Família por ser meu porto seguro. Em especial, aos meus pais Valdomiro Kalck e Sonia P. da Silva Kalck, sei que vocês sentiram muito minha falta, assim como eu senti saudade de vcs. Aos meus irmãos Adriana, Adilson, Adimilson, Andreia e em especial o meu irmão caçula Alex, que ficava contando os dias, para nos encontrar.

Aos meus padrinhos Daniel Pedro e Vera, pelas orientações e conversa fiadas. Não poderia esquecer do meu sobrinho Ricardo esse também ficava contando os dias.

Agradeço ao casal Grací e Filipe pela amizade e orientações, e por mostrar a oportunidade de continuação. Exemplos a ser seguido.

A todos que conheci em Barra do Garças, de modo especial ao Romário, sua tia Ana e família que foram as primeiras pessoas que nos acolheram nesta cidade. Não poderia esquecer da Irmã Tania, obrigado pelos conselhos e orientações.

Aos meus amigos e camaradas de laboratório. Ao Kevin, pelas discussões, e orientações no uso de Spray-LbL. Ao Marcos, Herica, Andreína, e Leandro pelos momentos de descontração. Aos demais colegas Rita, Alberto, Thaynara e Diogo. Obrigado pelo companheirismo. Tenho orgulho de fazer parte do GNM.

Agradeço à instituição Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Matérias - PPGMat, a todos os professores aos quais participaram de minha formação, capacitação e aprendizagem nesse período de estudo.

Agradeço à Marcia Helena secretária do PPGMat.

Agradeço a CAPES, pelo apoio, pois sem ajuda financeira não seria fácil terminar esse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Fungos e algas de plantas	2
1.1.1 Antracnose.....	3
1.1.2 Mancha de alga.....	6
1.2 Objetivos.....	9
1.3 Estrutura da dissertação.....	10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
2.1 Fractais.....	11
2.2 Dimensão fractal.....	13
2.2.1 Método <i>Box-counting</i>	15
2.3 Lei de escala	16
2.4 Modelos de deposição para o estudo do crescimento de superfícies.....	19
2.4.1 Modelo de Eden	19
2.4.2 Deposição aleatória (DA)	20
2.4.3 Deposição aleatória com relaxação de superfície	21
2.4.4 Deposição balística (DB) e a equação de Kardar-Parisi-Zhang.....	22
2.4.5 Deposição via epitaxia por feixe molecular (MBE).....	23
2.5 Inativação fotodinâmica	24
2.5.1 Mecanismo de inativação fotodinâmica.....	25
2.5.2 Fontes de Luz	26
2.5.2.1 Índice de Ultravioleta	27
2.5.3 Fotossensibilizadores	28
2.5.3.1 Laranja de Acridina.....	29
2.6 Técnica de deposição de FS	30
2.6.1 <i>Spray layer-by-layer</i>	31

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Fotossensibilizador Laranja de Acridina	33
3.2 Estimativa da Dose através do IUV	33
3.3 <i>Spray-LbL</i>	33
3.4 Análise da dinâmica de crescimento das colônias	34
3.5 Processamento de imagens	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Análise do Índice de Ultravioleta e Aplicação do FS	37
4.2 Dinâmica de crescimento.....	40
4.2.1 Velocidade de crescimento das colônias	44
5. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE A – DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA.....	71

MODELOS MATEMÁTICOS E ANÁLISE FRACTAL NA INVESTIGAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS

RESUMO

O uso crescente e indiscriminado de agrotóxicos, além de provocar intoxicação em seres vivos e meio ambiente e causar contaminação alimentar, pode ocasionar resistência aos produtos químicos, promovendo a seleção de microrganismos fitopatogênicos resistentes. Este é um grande problema nas áreas agrícolas e de saúde humana, conduzindo a necessidade de desenvolvimento de novas metodologias. A inativação fotodinâmica (IFD) é uma estratégia promissora que envolve a associação de um fotossensibilizador (FS) e luz, para inibição de crescimento de microrganismos. Neste trabalho o FS laranja de acridina, LA, foi depositado utilizando a técnica *spray layer-by-layer*, sendo escolhida devido a facilidade de aplicação em campo e alto controle da área de deposição. A efetividade do método foi avaliada pela análise da evolução do crescimento das colônias, em função da quantidade de camadas do FS aplicado em campo, em combinação com luz solar. Utilizou-se processamento de imagens e análise da teoria fractal na avaliação do crescimento das colônias. Os resultados demonstraram que o LA é um candidato a FS com aplicação em campo. Foi possível observar a redução da dinâmica de crescimento das colônias com o aumento da quantidade de camadas de FS, sugerindo que este decréscimo possa ser ocasionado pelo fenômeno de fotoativação. Os parâmetros referentes à fractalidade do sistema foram descritos por modelos matemáticos de crescimento de interfaces fractais e o conhecimento destes pode ajudar a identificar novas estratégias para controle de microrganismos fitopatogênicos que afetam diretamente a produção agrícola.

Palavras-chave: *Colletotrichum* sp., *Cephaluros* sp., laranja de acridina, velocidade de crescimento, processamento de imagens.

MATHEMATICAL MODELS AND FRACTAL ANALYSIS FOR THE INVESTIGATION OF THE PHOTODYNAMIC INACTIVATION IN PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISMS

ABSTRACT

The increasing and indiscriminate use of pesticides may lead to intoxication in living organisms as well as contamination of environment and foods. In addition, pesticides can cause resistance, promoting the selection of resistant phytopathogenic microorganisms. This is a major problem in the agricultural and human health areas, which leads to the need to develop new methodologies to address this problem. Photodynamic inactivation (PDI) is a promising strategy involving the association of a photosensitizer (PS), light, and molecular oxygen to inhibit the growth of microorganisms. In this work, the PS orange acridine, OA, was deposited using the layer-by-layer spray technique, which was chosen because of its ease to application in ambient condition and high control of the deposition area. The effectiveness of the method was evaluated by the analysis of the growth evolution of the colonies as a function of the amount of PS layers applied in ambient condition at presence of the sunlight. It was used image processing and analysis of the fractal theory in evaluating the growth of the colonies. The results revealed that OA is a candidate to PS for using in ambient condition. It was possible to observe the reduction of the growth dynamics of the colonies with the increase of the number of PS layers. This suggested that the decrease could be caused by the photoinactivation. The parameters related to the fractality of the system were described by mathematical models of fractal growth of interfaces. The knowledge of these parameters can help to identify new strategies for the control of phytopathogenic microorganisms that directly affect agricultural production.

Keywords: *Colletotrichum* sp., *Cephaleuros* sp., acridine orange, growth rate, image processing.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Sintomas de antracnose em frutos: (a) manga [Adaptado de (ROSSETTO, 2006)], (b) banana, (c) morango [Adaptado de (CANNON et al., 2012)], (d) caqui [Adaptado de (AGRONOVAS, 2015)] e (e) maracujá [Adaptado de (LIMA, 2015)]. 4
- FIGURA 2** – Sintomas de antracnose causado por *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de cajueiro (a) e goiabeira (b) [Adaptado de (CARDOSO et al., 2013; DUARTE, 2008; VIANA; CARDOSO; FREIRE, 2017)]. 4
- FIGURA 3** – Sintomas de antracnose causado por *Colletotrichum gloeosporioides* em cajueiro: (a) frutos jovens; (b) frutos maduros; (c) folhas; (d) ramos [Adaptado de (CARDOSO et al., 2013; VIANA; CARDOSO; FREIRE, 2017)]; (e) aspecto morfológico do fungo – estrutura acérvulo [Adaptado de (MACHADO; FACHI; SILVA, 2016)]. 6
- FIGURA 4** – Mancha de alga em folhas de abacateiro (*Persea americana* Mill) causadas por *Cephaleuros virescens* [Adaptado de (NELSON, 2008)]. 7
- FIGURA 5** – Lesões causadas por *Cephaleuros parasiticus* em goiabeira: (a) lesões na superfície superior das folhas [Adaptado de (NELSON, 2008)]; (b) tecidos necróticos da superfície superior das folhas; (c) lesões em frutos fortemente infectado; (d) tecidos necrosados na superfície de frutos; (e) seção transversal, apresentando o tecidos necrosado completo de uma folha, esporangióforos (sp), zoosporângios (zs) e necrose tecidual (nt) [Adaptado de (SUNPAPAO et al., 2016)]; e (f) conjunto de esporangióforos da superfície das folhas [Adaptado de (BROOKS et al., 2015)]. 8
- FIGURA 6** – Exemplos de fractais auto-similares; (a) conjunto de Cantor [Adaptado de (BARABÁSI; STANLEY, 1995)], (b) curva de Koch [Adaptado de (SILVA; SOUZA, 2010)] e (c) triângulo de Sierpinski [Adaptado de (BARABÁSI; STANLEY, 1995)]. 12
- FIGURA 7** – Exemplos de fractais na natureza; (a) árvores, (b) linhas de costa e (c) nuvens [Adaptado de (NUNES, 2006)]. 13

FIGURA 8 – Comparação entre a Dimensão Euclidiana e a Dimensão Fractal [Adaptado de (SIQUEIRA, 2005)].	14
FIGURA 9 – Representação de modelo de malha de quadrados sobreposto a imagem para estimativa da dimensão fractal [Adaptado de (PEDRO, 2014)]......	16
FIGURA 10 – Representação das etapas de crescimento de uma superfície. Pode-se notar dois regimes característicos: (I) crescimento descrito por uma lei de escala, e (II) a saturação. A figura indica um método comumente usado para estimar o tempo de saturação, t_{sat} , [Adaptado de (BARABÁSI; STANLEY, 1995)].	18
FIGURA 11 – Representação esquemática de agregados formados a partir do modelo de Eden [Adaptado de (BARABÁSI; STANLEY, 1995)].	19
FIGURA 12 – Esquema representando o modelo de deposição aleatória. .	20
FIGURA 13 – Esquema representando o modelo de deposição aleatória com relaxação de superfície.....	21
FIGURA 14 – Esquema representando o modelo de deposição balística...	22
FIGURA 15 – Esquema representando o modelo MBE [Adaptado de (BARRON, 2009)]......	23
FIGURA 16 – Esquema das etapas fotoquímicas e fotofísicas envolvidas na fotossensibilização [Adaptado de (KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002; RODRIGUES, 2012)]......	25
FIGURA 17 – Categorias de intensidades de IUV [Adaptado de(INPE, 2016b)]......	28
FIGURA 18 – Representação da estrutura molecular do LA [Adaptado de (AMADO, 2013)].	29
FIGURA 19 – Espectro de UV-Vis da solução de laranja de acridina.....	30
FIGURA 20 – Metodologia aplicada na fabricação de filmes <i>spray</i> -LbL [Adaptado de (AOKI, 2014; AOKI et al., 2012)]......	31

- FIGURA 21** – Fotografia do sistema experimental utilizado na deposição do FS, sobre a superfície das folhas de goiabeira e cajueiro. 34
- FIGURA 22** – Representação do ambiente de processamento e análise de imagens utilizando o software *ImageJ*. 35
- FIGURA 23** – Exemplos de folhas adultas de cajueiro utilizadas nos experimentos IFD e a localização das colônias de antracnose em sua superfície adaxial. 37
- FIGURA 24** – Exemplo de folhas adultas de goiabeira utilizadas nos experimentos de IFD, e a localização das colônias de alga em sua superfície adaxial. 38
- FIGURA 25** – Representação do IUV em função das horas do dia 19/07/2016 e a intensidade de luz solar na superfície (adaxial) das folhas de goiabeira, onde 0 representa a folha sem luz solar (sombra) e 1 representa a intensidade máxima da luz solar na superfície das folhas. 39
- FIGURA 26** – Representação do IUV em função das horas do dia 17/08/2016 e a intensidade de luz solar na superfície (adaxial) das folhas de cajueiro (antracnose), onde 0 representa a folha sem luz solar (sombra) e 1 representa a intensidade máxima da luz solar na superfície das folhas. 39
- FIGURA 27** – Influência da quantidade de camadas de FS, na evolução temporal do crescimento do padrão de colônias de alga. As barras de escala correspondem a 3mm. 41
- FIGURA 28** – Evolução temporal do contorno das colônias de alga. Cada contorno corresponde a um tempo de captura das imagens do crescimento das colônias. 42
- FIGURA 29** – Influência da quantidade de camadas de FS, na evolução temporal dos padrões de crescimento das colônias de antracnose. As barras de escala correspondem a 2mm. 42
- FIGURA 30** – Evolução temporal do contorno das colônias de antracnose. Cada contorno corresponde a um tempo de captura das imagens do crescimento das colônias. A barra de escala corresponde a 2mm. 43

FIGURA 31 – Acompanhamento da expansão radial de colônias de alga. O grupo controle corresponde a colônias sem FS. A outra curva é uma composição da observação das colônias antes e após aplicação do FS. ... 44

FIGURA 32 – Gráficos do raio médio em função do tempo de acompanhamento das colônias de alga: grupos controle e 5-LA. Nos detalhes das figuras, os ajustes correspondentes a região linear do gráfico. 44

FIGURA 33 – Gráficos do raio médio em função do tempo de acompanhamento das colônias de antracnose: controle, 5-LA, 10-LA e 20-LA. 45

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

IFD – Inativação fotodinâmica

FS – Fotossensibilizador

FSSs – Fotossensibilizadores

$N_r(A)$ – Número de quadrados de lado r que contenham parte do fractal A

μ – Constante

DF – Dimensão fractal

α – Coeficiente angular

\bar{h} – Altura média da superfície

$h(i, t)$ – Altura da coluna i no tempo t

i – Coluna

t – Tempo

L – Tamanho da matriz analisada

$W(L, t)$ – Rugosidade da interface

t_{sat} – Tempo de saturação ou tempo de crossover

W_{sat} – Rugosidade de saturação

W – Rugosidade de uma superfície

β – Expoente de crescimento

α – Expoente de rugosidade

D – Dimensão de imersão do objeto fractal

^0FS – Estado fundamental de baixa energia

$^1\text{FS}^*$ – Estado excitado singleto de curta duração

$^3\text{FS}^*$ – Estado excitado tripleto de vida longa

EROs – Espécies reativas de oxigênio

UVA – Raios ultravioleta A (315-400 nm)

UVB – Raios ultravioleta B (280-315 nm)

UVC – Raios ultravioleta C (100-280 nm)

IUV – Índice Ultravioleta

C – Constante de conversão equivalente a 40 Wm^{-2}

E_λ – Irradiância espectral na superfície

ϵ_λ – Espectro de ação eritêmica

< – Menor

> – Maior

\leq – Menor ou igual

π – Pi

LA – Laranja de acridina

S₀ – Estado fundamental

S₁ – Primeiro estado excitado singleto

S₂ – Segundo estado excitado singleto

LbL – *Layer-by-layer*

spray-LbL – *Spray layer-by-layer*

PGA – Poly(glutamic-acid)

PAH – Poly(allylamine)

CIE – *International Commission on Illumination*

PIF – Produção Integrada de Frutas

INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

MBE – *Molecular Beam Epitaxy*

IUV_{méd} – Índice de Ultravioleta médio

Δt – Intervalo de tempo

i_v – Valor de uma unidade de índice de ultravioleta (25 mWm⁻²)

$g(x, y)$ – Imagem limiarizada

$f(x, y)$ – Imagem de entrada

Vcres – Velocidade de crescimento radial ou taxa de expansão radial

T – Valor do limiar

1-LA – Grupos com aplicação 1 camada de FS laranja de acridina

5-LA – Grupos com aplicação 5 camadas de FS laranja de acridina

10-LA – Grupos com aplicação 10 camadas de FS laranja de acridina

20-LA – Grupos com aplicação 20 camadas de FS laranja de acridina

1. INTRODUÇÃO

A aplicação de agrotóxicos é o método mais utilizado para o controle de patógenos em plantas (FRANCA et al., 2015; GHINI; MIMATI, 2002; MATIELLO; BONALDO, 2013). Porém, o uso intensivo e/ou inapropriado de produtos químicos promove a seleção de microrganismos fitopatogênicos resistentes (GHINI; MIMATI, 2002), além de provocar intoxicação em homens e animais e a contaminação de alimentos e do meio ambiente (CASSAL et al., 2014; CHIME et al., 2015; DE MENEZES et al., 2014b; GHINI; MIMATI, 2002; JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; RIBAS; MATSUMURA, 2009). Nesse contexto, é de grande importância o desenvolvimento de novos métodos para o controle de microrganismos fitopatogênicos (STANGARLIN et al., 1999).

A inativação fotodinâmica é uma estratégia promissora na inibição de crescimento de microrganismos patogênicos no meio ambiente. O conhecimento dos mecanismos, em relação à forma como as células reagem após o processo de irradiação, é de extrema importância e fornece indicação do crescimento das colônias. Esta análise pode ser realizada a partir de resultados de processamento de imagens (TRESCHER, 2014).

O uso de sistemas de análise de imagem permite a extração de informações quantitativas e a caracterização detalhada de variações morfológicas, encontradas no processo de formação e crescimento de sistemas complexos (DONNELLY; WILKINS; BODDY, 1995; PAPAGIANNI, 2006). A análise de imagens fornece um meio extremamente rápido e acessível de obtenção de informações morfológicas através de fotografias, além de ser um método não destrutivo para exame de sistemas biológicos, com aplicação em estudo de células e crescimento de culturas de microrganismos, entre outros (AMARAL et al., 1997; TRESCHER, 2014;

VECHT-LIFSHITZ; ISON, 1992). Apesar da grande introdução de parâmetros morfológicos quantitativos, com relação ao crescimento de microrganismos, as estruturas de colônias são difíceis de serem descritas, pois como muitas estruturas irregulares observadas na natureza, as colônias apresentam padrões fractais (PAPAGIANNI, 2006; TRESCHER, 2014).

A teoria de análise fractal aplica-se na descrição de estruturas irregulares e complexas, sendo proposta 1975 por Mandelbrot (BARABÁSI; STANLEY, 1995) para descrever a geometria das reais formas da natureza e identificar uma classe de objetos com formas irregulares (ASSIS et al., 2008; CRUZ, 2000; DA COSTA, 2014; SILVA; SOUZA, 2010). Na microbiologia a análise fractal foi introduzida para descrever padrões de crescimento, sendo de importância fundamental na avaliação da variação morfológica das estruturas (OBERT; PFEIFER; SERNETZ, 1990) que podem estar correlacionadas a patogenicidade (HUBBARD; MARKIE; POULTER, 1986), atividade metabólica e produção enzimática (HERMERSDÖRFER et al., 1987). Por exemplo, o crescimento de colônias de bactérias e fungos tem sido estudado por biólogos, físicos e matemáticos, com o propósito de analisar os mecanismos cooperativos que levam a formação de estruturas complexas (BARABÁSI; STANLEY, 1995).

1.1 Fungos e algas de plantas

Os fungos são organismos eucariontes, quimio-heterotróficos, de nutrição absorptiva com digestão extracorpórea parcial (TRESCHER, 2014) largamente distribuídos na natureza, vivendo principalmente como saprófitos, parasitas ou em mutualismo com outros organismos (NASCIMENTO, 2015). Todas as plantas podem ser atacadas por algum tipo de fungo parasita, os quais provocam doenças como podridões de caules e frutos, seca de ponteiros, manchas foliares e infecções latentes (DE MENEZES, 2012; MICHEREFF, 2001).

As algas são caracterizadas como organismos eucarióticos uni ou multicelulares, geralmente com parede celular formada de celulose. São consideradas seres autotróficos, isto é, são capazes de realizar fotossíntese (GALICIA-GARCÍA, 2015; LOPES, 2009; SILVA; FUJII; SCAFF, 2010), e

apresentam origem evolutiva diferente, e como consequência têm formas e modos de vida muito variados, sendo possível identificar casos de espécies de algas verdes, vermelhas e pardas que são parasitas. O grupo das algas verdes destacam-se como sendo as espécies mais comuns e os hospedeiros podem englobar plantas terrestres e animais, incluindo o homem (GALICIA-GARCÍA, 2015).

1.1.1 Antracnose

A antracnose, causada por *Colletotrichum* sp., é conhecida por ser um patógeno agressivo que ocasionam doenças e provocam perdas em diversas culturas (HYDE et al., 2009), sendo considerada uma doença de extrema importância econômica no Brasil (SERRA; COELHO; MENEZES, 2008), promovendo grandes perdas no campo e em pós-colheita (FILHO; OLIVEIRA; MENEZES, 2003), afetando principalmente a produção de frutos (CANNON et al., 2012) podendo danificar até 100% dos frutos armazenados (CHOUDHURY; COSTA; DOS ANJOS, 2003; DEAN et al., 2012).

O gênero *Colletotrichum* sp. pertence ao Reino Fungi, filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, ordem Glomerellales, família Glomerellaceae (ARMESTO, 2013; COSTA et al., 2003; DA COSTA et al., 2013; MARTIS et al., 2005; MYCOBANK, 2017). Dentre os principais complexos de espécies *Colletotrichum*, destacam-se: *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (DAMM et al., 2005; DE MENEZES, 2012; DE MENEZES et al., 2014a, 2014b; DEAN et al., 2012).

O gênero *Colletotrichum* sp. é um dos mais comum e importantes grupos de fungos fitopatogênicos de plantas, ocasionando perdas econômicas relevantes em regiões agrícolas tropicais e subtropicais, afetando até mesmo culturas temperadas (BRAGANÇA et al., 2016; CANNON et al., 2012; DEAN et al., 2012; HYDE et al., 2009; MENEZES, 2006; SERRA; COELHO; MENEZES, 2008; WHITELAW-WECKERT et al., 2007). Este gênero envolve espécies que causam doenças de alta relevância econômica em culturas perenes e anuais, leguminosas, cereais e hortaliças, assim como inúmeras frutíferas (KIMATI et al., 1997; SERRA; COELHO; MENEZES, 2008) como apresentado na FIGURA 1.

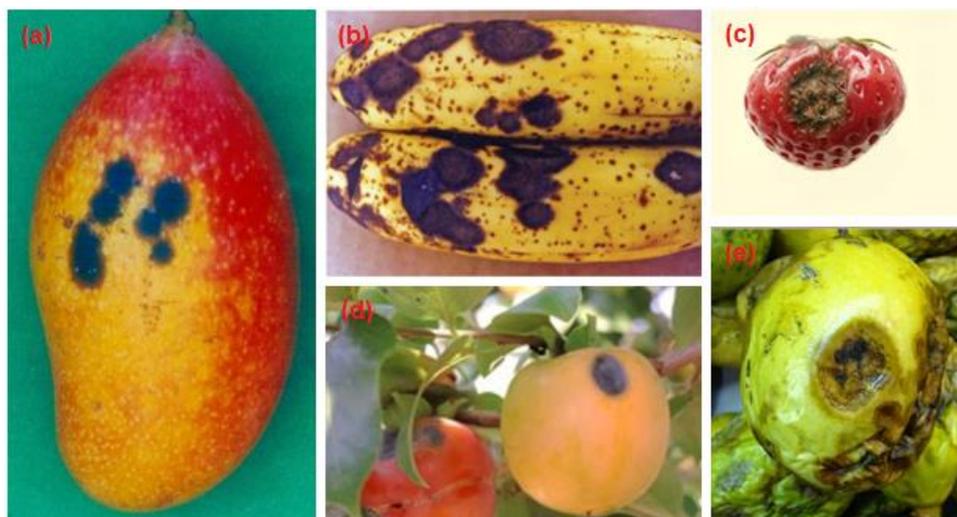


FIGURA 1 – Sintomas de antracnose em frutos: (a) manga [Adaptado de (ROSSETTO, 2006)], (b) banana, (c) morango [Adaptado de (CANNON et al., 2012)], (d) caqui [Adaptado de (AGRONOVAS, 2015)] e (e) maracujá [Adaptado de (LIMA, 2015)].

Este patógeno interage de modo diversificado de acordo com cada hospedeiro (KIM; OH; YANG, 1999). O sintoma característico da antracnose são lesões arredondadas, formando colônias de tamanhos variados e necróticas, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada (FIGURA 2).



FIGURA 2 – Sintomas de antracnose causado por *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de cajueiro (a) e goiabeira (b) [Adaptado de (CARDOSO et al., 2013; DUARTE, 2008; VIANA; CARDOSO; FREIRE, 2017)].

O gênero *Colletotrichum* sp. ocorrem em uma extensa gama de culturas, que são economicamente importantes, como o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), mangueira (*Mangifera indica* L.), goiabeira

(*Psidium guajava* L.) mamoeiro (*Carica papaya* L.), maracujazeiro (*Passiflora* spp.), bananeira (*Musa* spp.), caquizeiro (*Diospyros kaky* L.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), citros (*Citrus* spp.) videira (*Vitis* sp.), entre outros (CANNON et al., 2012; CARDOSO et al., 2013; DEAN et al., 2012; FILHO; OLIVEIRA; MENEZES, 2003; GALLI et al., 2009, 2015; GARRIDO; SÔNEGO, 2004; KIMATI et al., 1997; LIM; MANICOM, 2003; MEDEIROS; BARRETO; FREIRE, 2011; ROZWALKA, 2003; WHITELAW-WECKERT et al., 2007).

A antracnose é uma das doenças mais importantes sob o aspecto econômico que afetam a cultura de cajueiro, causando consideráveis perdas na produção e qualidade dos frutos (BARROS et al., 1993; CARDOSO et al., 2013; CARVALHO, 2010; CAVALCANTI et al., 2000; DE ARAÚJO et al., 2010; KIMATI et al., 1997; PEREIRA et al., 2005; SEBRAE, 2013; VIANA; CARDOSO; FREIRE, 2017). As perdas anuais na produção de caju devido a esta doença são estimadas entre 40 a 80% (BARROS et al., 1993; CARDOSO et al., 2013; DE ARAÚJO et al., 2010; SEBRAE, 2013; VIANA; CARDOSO; FREIRE, 2017). No entanto, perdas na qualidade do produto e redução do rendimento industrial podem elevar ainda mais esse percentual (CARDOSO et al., 2013).

Os sintomas podem ocorrer em ambas as faces das folhas, ramos, flores, frutos e pseudofrutos (FIGURA 3) (CARDOSO et al., 2013), e são consistentes de lesões necróticas com formato e tamanho irregular e de coloração pardo-avermelhadas (CARDOSO et al., 2013; CARVALHO, 2010; DE ARAÚJO et al., 2010; KIMATI et al., 1997; MEDEIROS; BARRETO; FREIRE, 2011; PEREIRA et al., 2005; SEBRAE, 2013), resultando na deformação das folhas e frutos (FIGURA 3. b, c) (CARDOSO et al., 2013; KIMATI et al., 1997; PEREIRA et al., 2005). Na inflorescência, os sintomas manifestam causando queima e queda de flores e frutos jovens, ocasionando enormes prejuízos (FIGURA 3. a) (CARVALHO, 2010; KIMATI et al., 1997). Nos frutos apresentam lesões necróticas escuras, deprimidas (FIGURA 3. b), atingindo mais de 50% da superfície, provocando queda, deformações e atrofiamento (CARDOSO et al., 2013; CARVALHO, 2010; KIMATI et al., 1997).

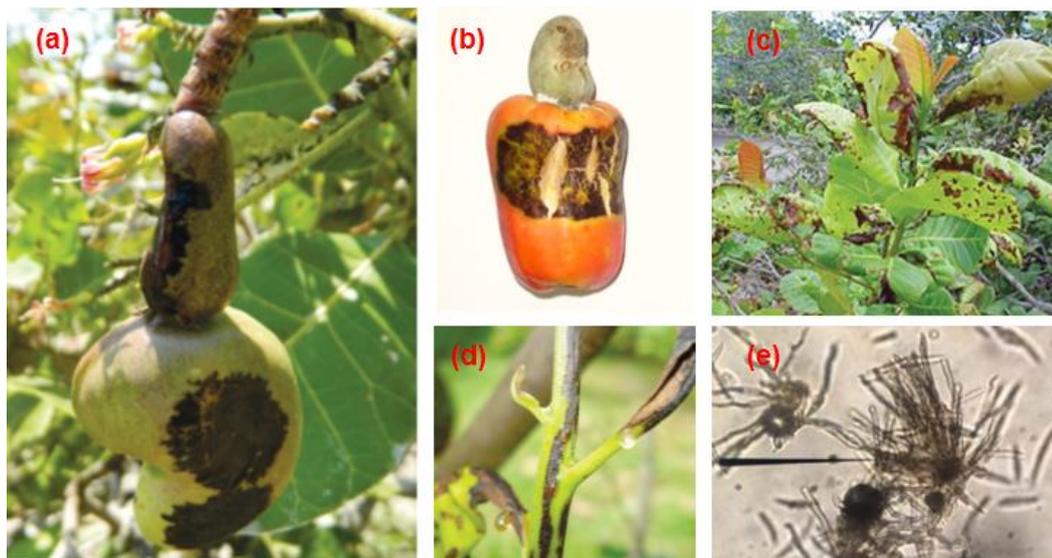


FIGURA 3 – Sintomas de antracnose causado por *Colletotrichum gloeosporioides* em cajueiro: (a) frutos jovens; (b) frutos maduros; (c) folhas; (d) ramos [Adaptado de (CARDOSO et al., 2013; VIANA; CARDOSO; FREIRE, 2017)]; (e) aspecto morfológico do fungo – estrutura acérvulo [Adaptado de (MACHADO; FACHI; SILVA, 2016)].

O controle da antracnose em campo é feito basicamente por meio de métodos culturais e químicos (BARBOSA; LIMA, 2010; FISCHER et al., 2012; GALLI et al., 2015; JUNQUEIRA et al., 2011; KIMATI et al., 1997; NOZAKI; DETONI; DONADEL, 2013; SOARES; LOURENÇO; AMORIM, 2008). Através do controle químico, são utilizados vários fungicidas (NOZAKI; DETONI; DONADEL, 2013), muitos dos quais não são registrados para esta finalidade (KIMATI et al., 1997; PINHEIRO, 2006).

1.1.2 Mancha de alga

As algas da família Trentepohliaceae não são aquáticas, mas sim subaéreas, crescendo em solos úmidos, rochas, casca de árvores, folhas, caules e frutos. As células são uni ou multinucleadas, com vários cloroplastos parietais que podem ser discoides ou em forma de banda, às vezes aparecendo reticulados (BROOKS et al., 2015; LÓPEZ-BAUTISTA; WATERS; CHAPMAN, 2002).

As algas parasitas de plantas tem entre suas principais espécies, *Cephaleuros virescens* e *Cephaleuros parasiticus* (AGRIOS, 2005; NELSON,

2008). O gênero *Cephaleuros* sp. uma alga verde do reino Archaeplastida, pertence à classe Ulvophyceae, de uma ordem única Trentepohliales (divisão Chlorophyta), família Trentepohliaceae (LÓPEZ-BAUTISTA; WATERS; CHAPMAN, 2002; NELSON, 2008; SUNPAPAO et al., 2016; SUTO; OHTANI, 2009), é o causador da doença conhecida como mancha de alga ou ferrugem amarela, sendo encontradas em regiões tropicais e subtropicais (ALMEIDA; VASCONCELOS; FREIRE, 1985; MALAGI et al., 2011; MERIDA; PALMATEER, 2014; SUTO; OHTANI, 2009), ocorrendo principalmente em condições de temperatura e umidade elevada (KIMATI et al., 1997; NELSON, 2008), clima favorável para o seu crescimento e reprodução (NELSON, 2008).

As colônias de alga são lesões irregularmente circulares de tamanhos variados, podendo ser detectadas de forma isolada ou coalescente, apresentando coloração alaranjada ou ferruginosa de aspecto saliente e textura semelhante a feltro (HAN et al., 2011; KIMATI et al., 1997; MALAGI et al., 2011; NELSON, 2008) como mostra a FIGURA 4.



FIGURA 4 – Mancha de alga em folhas de abacateiro (*Persea americana* Mill) causadas por *Cephaleuros virescens* [Adaptado de (NELSON, 2008)].

Geralmente as manchas ocorrem na face adaxial (superior) das folhas, principalmente em locais com maior umidade ou sombreados (KIMATI et al., 1997; MERIDA; PALMATEER, 2014). Com o tempo, essas lesões tendem a se expandir, apresentando superfície lisa e de coloração pardo-acinzentada, ocupando uma grande extensão do volume foliar. Como consequência do grande volume foliar ocupado, os danos causados à planta é a redução da área fotossintética normal das folhas (MALAGI et al., 2011; MERIDA; PALMATEER, 2014; POLTRONIERI et al., 2013), assim resultando na redução do vigor, afetando o crescimento das plantas (AGROLINK, 2016; MERIDA; PALMATEER, 2014).

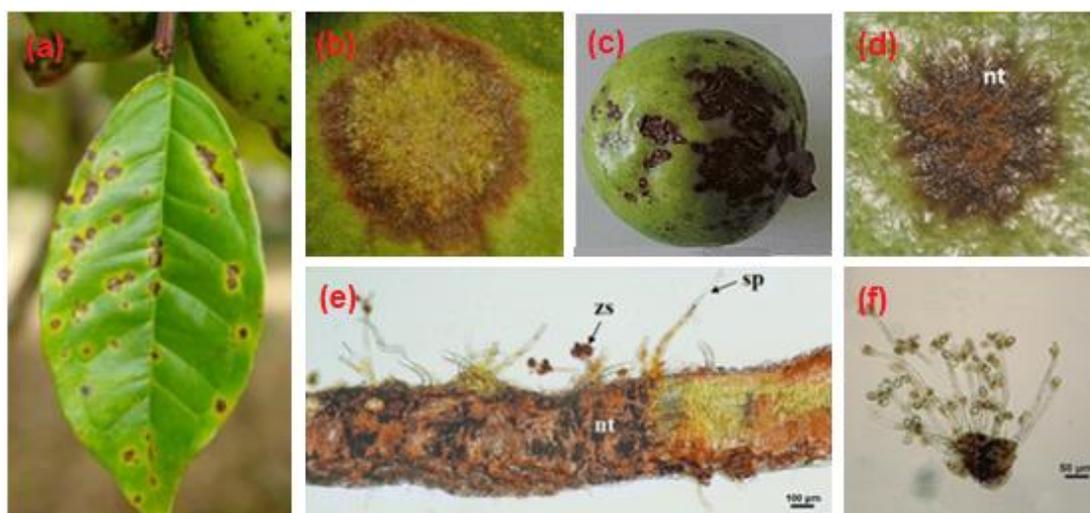


FIGURA 5 – Lesões causadas por *Cephaleuros parasiticus* em goiabeira: (a) lesões na superfície superior das folhas [Adaptado de (NELSON, 2008)]; (b) tecidos necróticos da superfície superior das folhas; (c) lesões em frutos fortemente infectados; (d) tecidos necrosados na superfície de frutos; (e) seção transversal, apresentando o tecido necrosado completo de uma folha, esporangióforos (sp), zoosporângios (zs) e necrose tecidual (nt) [Adaptado de (SUNPAPAO et al., 2016)]; e (f) conjunto de esporangióforos da superfície das folhas [Adaptado de (BROOKS et al., 2015)].

O gênero *Cephaleuros* sp. apresenta ampla gama de hospedeiros, que são economicamente importantes, como o abacateiro (*Persea americana* Mill), laranjeira (*Citrus sinensis* L.), goiabeira (*Psidium guajava* L.), jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg), mangueira (*Mangifera indica* L.), seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.), urucuzeiro (*Bixa orellana* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) entre

outros (AGROLINK, 2016; KIMATI et al., 1997; NELSON, 2008; POLTRONIERI et al., 2013).

Em goiabeiras, além de reduzir a área fotossintética normal e o vigor da planta, pode ocasionar a desfolha, morte dos galhos, e necrose tecidual significativa (FIGURA 5), além de reduções na safra e perdas na comercialização dos frutos (MARLATT; CAMPBELL, 1980; NELSON, 2008; SUNPAPAO et al., 2016). O controle de mancha de alga em campo, é realizado através da combinação de métodos culturais e aplicação de fungicidas (NELSON, 2008).

Neste trabalho analisou-se a aplicação do princípio da inativação fotodinâmica, como uma estratégia na inibição de crescimento de antracnose e mancha de alga. O conhecimento dos mecanismos relacionados a forma como as células reagem após o processo de irradiação fornece indicação do modo como crescem as colônias. Esta análise pode ser realizada a partir de resultados de processamento de imagens (TRESCHER, 2014).

1.2 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi investigar a variação morfológica e a dinâmica de crescimento de colônias de alga e antracnose, a luz da teoria de análise fractal, como modelo com potencialidade para ser utilizado em estudos de dinâmica de crescimento celular.

A viabilidade das colônias foi analisada frente aos efeitos da inativação fotodinâmica, combinando a utilização do FS laranja de acridina e luz solar. O fotossensibilizador foi aplicado usando a técnica de deposição *spray* camada-por-camada. Este tipo de análise além de indicar os mecanismos responsáveis pela reprodução do microrganismo pode guiar pesquisadores na busca de identificação de novas estratégias para controle de pragas na agricultura.

1.3 Estrutura da dissertação

Além do capítulo de introdução a dissertação é composta de fundamentação teórica, referente à teoria fractal e inativação fotodinâmica (Capítulo 2). Os materiais e métodos experimentais são apresentados no Capítulo 3. Os resultados e discussão no Capítulo 4, e conclusão (Capítulo 5), seguido de referências e apêndice com divulgação científica realizado no período do mestrado.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

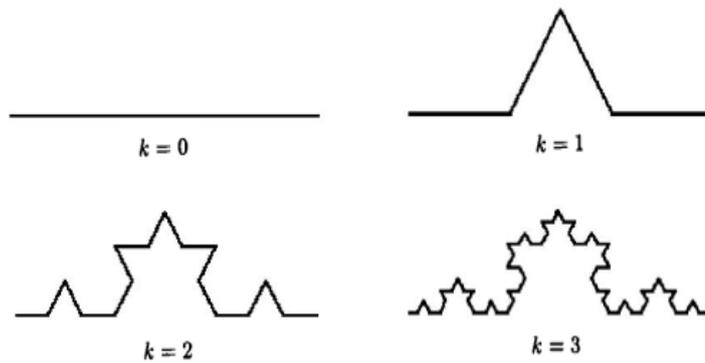
2.1 Fractais

A palavra “fractal”, deriva do latim *fractus*, que significa fração ou quebradiço, indicando irregularidade que designa um objeto ou estrutura a qual não possuem um número inteiro como dimensão. O emprego desse termo foi atribuído por Benoit Mandelbrot em 1975 para descrever a geometria das reais formas da natureza e identificar uma classe de objetos com formas irregulares (ASSIS et al., 2008; CRUZ, 2000; DA COSTA, 2014; SILVA; SOUZA, 2010).

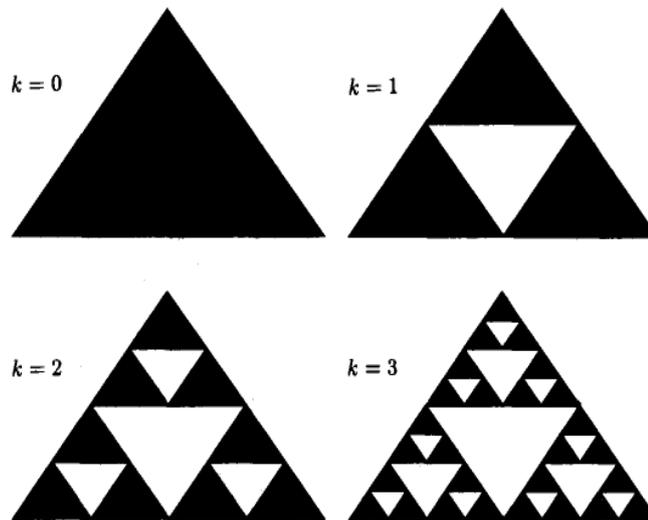
Os fractais são objetos com formas geométricas que a Geometria Euclidiana não é capaz de descrever adequadamente, devido principalmente a três características fundamentais que os definem e distinguem de outras formas: dimensão fractal, auto-semelhança em diferentes níveis de escala e estruturas geométricas de complexidade infinita (GULICK; 1992 apud BACKES; BRUNO, 2005). Os objetos fractais podem ser classificados em dois tipos: auto-similares (do inglês, *self-similar*) ou auto-afins (do inglês, *self-affine*) (BRAZ, 2014; PEDRO, 2014). Os fractais auto-similares são conhecidos como isotrópicos, pois a modificação de escala da dimensão do objeto é aplicada com o mesmo fator de escala em diferentes direções (ASSIS et al., 2008; BRAZ, 2014; MANDELBROT, 1967), ou seja, consiste em se obter sempre réplicas idênticas através do mesmo fator de redução. (CRUZ, 2000; FUZZO, 2009). Esse tipo de auto-similaridade só existe em figuras geradas por processos matemáticos, como por exemplo, o conjunto de Cantor (FIGURA 6.a), curva de Koch (FIGURA 6.b) e o triângulo de Sierpinski (FIGURA 6.c) (NUNES, 2006).



(a)



(b)



(c)

FIGURA 6 – Exemplos de fractais auto-similares; (a) conjunto de Cantor [Adaptado de (BARABÁSI; STANLEY, 1995)], (b) curva de Koch [Adaptado de (SILVA; SOUZA, 2010)] e (c) triângulo de Sierpinski [Adaptado de (BARABÁSI; STANLEY, 1995)].

Os fractais auto-afins são anisotrópicos, pois a modificação de escala da dimensão do objeto não é aplicada com o mesmo fator de escala em todas as direções (ASSIS et al., 2008; BRAZ, 2014; GOMES, 2013; MANDELBROT, 1985; NUNES, 2006). Ou seja, não há mais réplicas, e sim figuras obtidas através de modificações afins, que são identicamente formados por mini-cópias, mas não mantêm fixas as proporções originais (ASSIS et al., 2008; CRUZ, 2000; FUZZO, 2009). Existem muitas formas na natureza, que apresentam estruturas de auto-afinidade, como por exemplo, árvores (FIGURA 7.a), linhas de costa (FIGURA 7.b) e nuvens (FIGURA 7.c) (NUNES, 2006; PINTO, 2001).

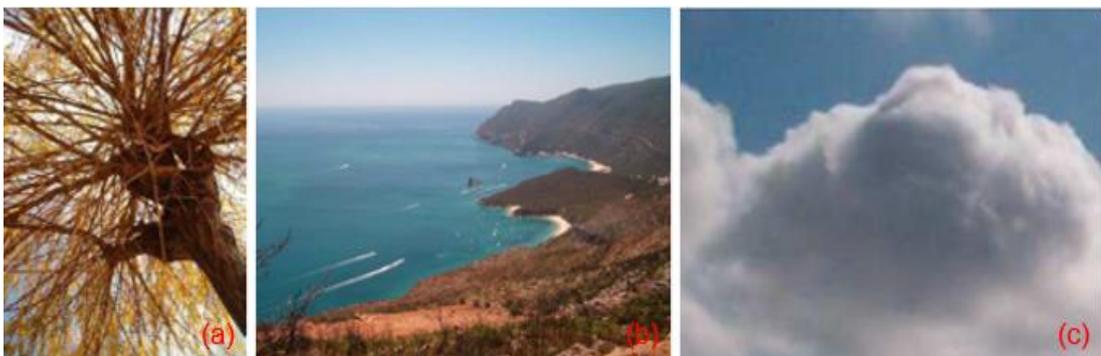


FIGURA 7 – Exemplos de fractais na natureza; (a) árvores, (b) linhas de costa e (c) nuvens [Adaptado de (NUNES, 2006)].

2.2 Dimensão fractal

Normalmente, os objetos fractais podem ser descritos usando o parâmetro chamado de dimensão fractal, DF. Ao contrário do que é observado na Geometria Euclidiana, em que, um ponto tem dimensão 0, uma curva dimensão 1, uma superfície dimensão 2 e um volume no espaço, dimensão 3, no qual o valor da dimensão representa a dimensionalidade do espaço onde o objeto está inserido, a dimensão fractal representa o nível de irregularidade de uma figura ou objeto fractal. Essa diferença nas definições faz com que a dimensão fractal assumam valores fracionários.

O fato da dimensão fractal ser um valor fracionário se deve ao grau de ocupação do objeto no espaço e também por considerar sua irregularidade. Desta maneira, quanto maior a irregularidade de uma figura ou objeto, maior

será sua dimensão fractal (BACKES; BRUNO, 2005; BRAZ, 2014; DA COSTA, 2014; SILVA; SOUZA, 2010). Em comparação com a Geometria Euclidiana, a dimensão fractal não é uma quantidade inteira, ela apresenta dimensões entre 1 e 2 para curvas irregulares e entre 2 e 3 para superfícies irregulares, como ilustrado na FIGURA 8.

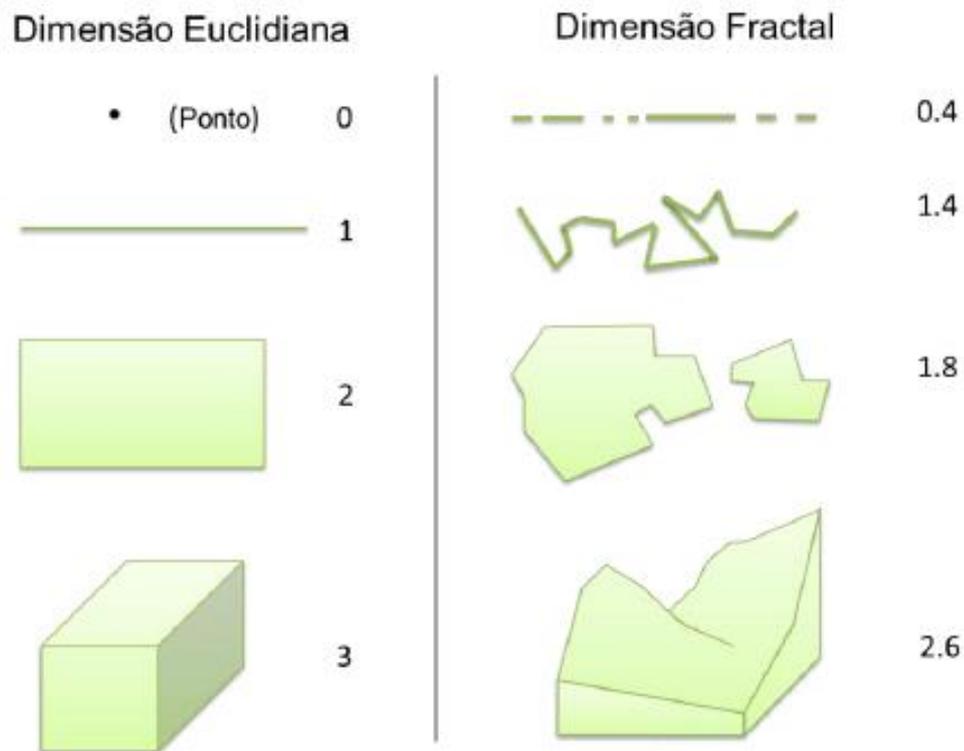


FIGURA 8 – Comparação entre a Dimensão Euclidiana e a Dimensão Fractal [Adaptado de (SIQUEIRA, 2005)].

Atualmente o conceito de fractal, especialmente a dimensão fractal, vem sendo aplicada em diversas áreas do conhecimento, como por exemplo, estudos de sistemas caóticos, caracterização de objetos, análises e reconhecimento de padrões em imagens; análises de texturas e medições de comprimento de curvas (BACKES; BRUNO, 2005), e também é extremamente adequado para investigação e descrição matemática de geometrias complexas, como por exemplo, caracterização e análises de filmes poliméricos (TAM; MATSUURA; TREMBLAY, 1991; TAM; TREMBLAY, 1993), morfologias de superfície em filmes automontados (DE SOUZA, 2002), caracterização de superfície irregulares em partículas

(AVNIR; FARIN; PFEIFER, 1985; PFEIFER; AVNIR, 1983), morfologia da superfície em catálises (GUTFRAIND; SHEINTUCH; AVNIR, 1991; JACKSON, 1989; SERI-LEVY; AVNIR, 1991) e em cultura de microrganismos (FUJIKAWA; MATSUSHITA, 1989, 1991; MATSUYAMA; MATSUSHITA, 1993; MEAKIN, 1986; OBERT; PFEIFER; SERNETZ, 1990).

Na literatura podem ser encontradas diversas abordagens e métodos para estimativa da dimensão fractal de um objeto ou imagem, contudo, uma ampla gama desses métodos se baseia na dimensão de Hausdorff (um dos primeiros métodos de estimativa da dimensão não inteira). Os principais métodos são: Massa Raio, Análise intersecção Acumulativa, *Box-Counting*, *Dividers (Compass)* e *Bouligand-Minkowski*. Entretanto nem todos os métodos podem ser aplicados a qualquer tipo de estrutura, porque cada método se baseia num tipo de medição diferente do objeto a ser analisado (BACKES; BRUNO, 2005).

2.2.1 Método *Box-counting*

O método *box-counting*, também conhecido por “dimensão por contagem de caixas”, foi utilizado nesse trabalho para estimativa da dimensão fractal. A dimensão por contagem de caixas é uma das técnicas mais conhecidas e utilizadas na determinação da dimensão fractal de um objeto ou imagem, devido a sua simplicidade e facilidade no cálculo matemático aplicado e implementação computacional (BACKES; BRUNO, 2005; BRAZ, 2014).

Neste método, utiliza-se a sobreposição da imagem com uma malha de quadrados de lado r de tamanhos determinados e por contagem obtém-se o número de quadrados necessárias para cobrir toda a extensão do fractal, ou seja, um certo número N que depende do tamanho r , isto é, $N(r)$, sendo representado pela seguinte relação (COELHO; COSTA, 1995):

$$N_r(A) = \mu \cdot r^{-DF} \quad (2.1)$$

na qual $N_r(A)$ é o número de quadrados de lado r que contenham parte do fractal A , μ é uma constante e DF a dimensão fractal. Com base na relação (2.1) a dimensão fractal pode ser determinada como sendo:

$$DF = -\lim_{r \rightarrow 0} \frac{\ln(N_r(A))}{\ln(r)} \quad (2.2)$$

A cada etapa a malha é refinada, modifica-se o tamanho dos quadrados e repete-se o procedimento, como pode ser observado na FIGURA 9.

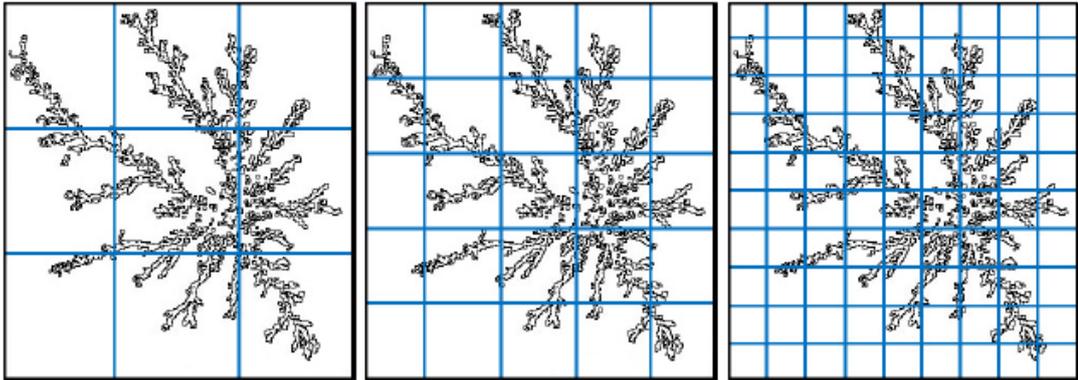


FIGURA 9 – Representação de modelo de malha de quadrados sobreposto a imagem para estimativa da dimensão fractal [Adaptado de (PEDRO, 2014)].

Para este trabalho, a determinação do tamanho dos quadrados foi executada através do *software* computacional *ImageJ* (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Ao plotar um gráfico do logaritmo de $(N_r(A))$ em função do logaritmo de (r) , obtém-se uma aproximação de uma reta linear com coeficiente angular, α , o qual determina a inclinação do gráfico, deste modo proporciona o valor da dimensão fractal do objeto ou imagem que está sendo analisada (FALCONER, 1990).

2.3 Lei de escala

O crescimento de superfícies é observado tanto em processos naturais como em laboratório, e o comportamento típico observado quando lidamos com crescimento de superfícies ou estruturas fractais é a lei de escala (FERREIRA, 2009). Assim superfícies fractais podem ser definidas como um conjunto de partículas com alturas diferentes. Conceitos como

rugosidade podem ser substituídos por expoentes que não se referem à rugosidade propriamente dita, mas à forma com que a rugosidade muda quando a escala de observação também muda (DE SOUZA, 2002; GOMES, 2013; TRESCHER, 2014).

Para caracterizar quantitativamente a formação de uma superfície, é necessário a introdução de duas funções, a altura média da superfície e a rugosidade da interface. A altura média da superfície, \bar{h} , pode ser definida como:

$$\bar{h}(t) \equiv \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L h(i, t) \quad (2.3)$$

onde $h(i, t)$ corresponde à altura da coluna i no tempo t e L o tamanho da matriz analisada. Se a taxa de crescimento for constante, a altura média aumenta linearmente com o tempo,

$$\bar{h}(t) \sim t \quad (2.4)$$

A rugosidade da interface, $W(L, t)$, que é caracterizada pela largura da interface, é descrita pela flutuação na altura, sendo matematicamente definida pela expressão:

$$W(L, t) \equiv \sqrt{\frac{1}{L} \sum_{i=1}^L [h(i, t) - \bar{h}(t)]^2} \quad (2.5)$$

A rugosidade de uma superfície, W , é monitorada quantitativamente pela medida da altura de cada ponto da interface em função do tempo. O crescimento de qualquer superfície pode ser descrito por duas etapas: uma inicial com uma forte variação de W em função do tempo, seguida de uma estabilização ou saturação na rugosidade da interface, $W(L, t) \sim W_{sat}$ (FIGURA 10). O tempo para atingir esta saturação é chamado de tempo de crossover ou tempo de saturação, t_{sat} , como pode ser observado na FIGURA 10 (BARABÁSI; STANLEY, 1995; CRUZ, 2000; DE SOUZA, 2002).

A rugosidade varia com o tempo e com o valor da rugosidade da interface. Para tempos menores que o tempo de saturação de rugosidade, $W(L, t)$ aumenta como uma potência do tempo:

$$W(L, t) \sim t^\beta \quad (2.6)$$

sendo o expoente β chamado de expoente de crescimento que caracteriza a dependência temporal do processo de formação da superfície.

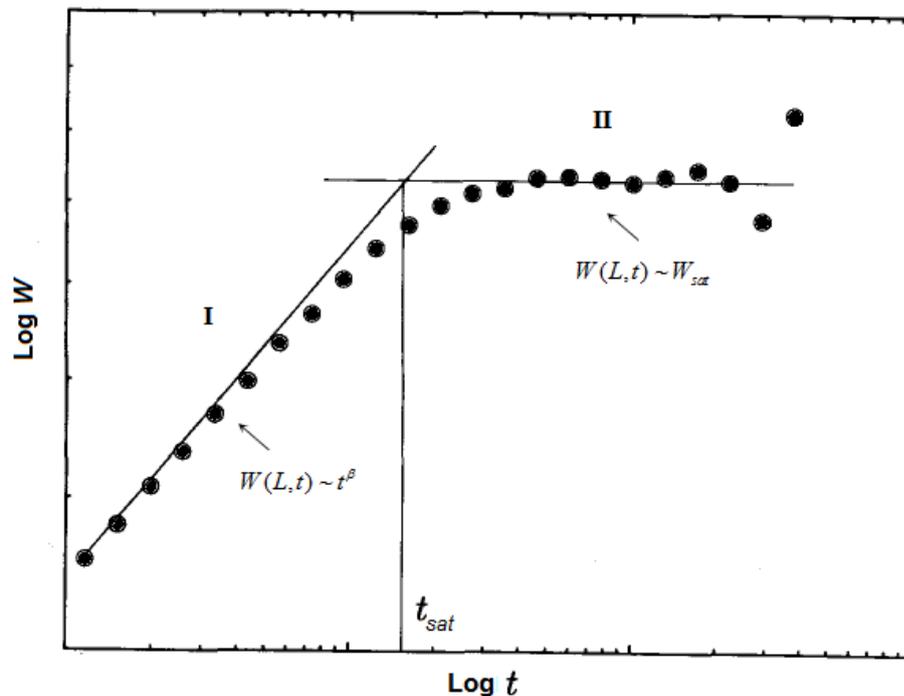


FIGURA 10 – Representação das etapas de crescimento de uma superfície. Pode-se notar dois regimes característicos: (I) crescimento descrito por uma lei de escala, e (II) a saturação. A figura indica um método comumente usado para estimar o tempo de saturação, t_{sat} , [Adaptado de (BARABÁSI; STANLEY, 1995)].

Quando a observação é feita em tempos superiores ao tempo de saturação, existe uma relação entre o tamanho da matriz analisada (L) e o valor de $W(L, t)$ (DE SOUZA, 2002). Esta relação é expressa pela lei de potência:

$$W_{sat}(L) \sim L^\alpha \quad (2.7)$$

sendo α chamado de expoente de rugosidade o qual caracteriza a rugosidade de uma interface saturada. Este expoente está relacionado com a dimensão fractal de uma superfície, DF, por:

$$DF = D - \alpha(t) \quad (2.8)$$

sendo D a dimensão de imersão do objeto fractal (1, 2 ou 3).

2.4 Modelos de deposição para o estudo do crescimento de superfícies

Os modelos de crescimento são ferramentas teóricas que correspondem a uma forma de determinar os expoentes de escala que caracterizam superfícies.

2.4.1 Modelo de Eden

O modelo de Eden proposto em 1961 para investigação da formação de colônia de bactérias e culturas de tecidos (BARABÁSI; STANLEY, 1995) propõe que o crescimento ocorre a partir de uma região de nucleação que pode ser uma linha, por exemplo. Novas partículas ocuparão sítios vazios e a escolha será aleatória, com a mesma probabilidade de ocupação para todos os sítios da interface.

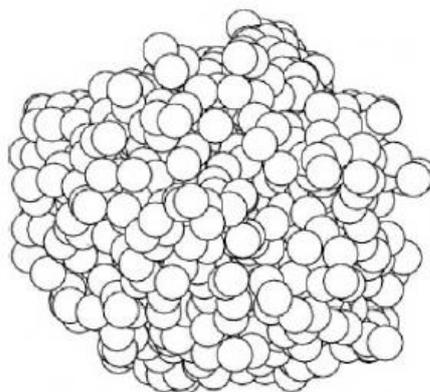


FIGURA 11 – Representação esquemática de agregados formados a partir do modelo de Eden [Adaptado de (BARABÁSI; STANLEY, 1995)].

O resultado é uma estrutura compacta (exceto por alguns sítios vazios próximos a borda) com superfície bastante sinuosa, como representado na

FIGURA 11. Os resultados numéricos para os expoentes de rugosidade e crescimento, quando $D = 2$, obtidos por simulação computacional são respectivamente $\alpha \sim 0,5$ e $\beta \sim 0,33$ (BARABÁSI; STANLEY, 1995).

2.4.2 Deposição aleatória (DA)

Nesse modelo, a deposição das partículas é realizada verticalmente em um sítio específico do substrato “sorteado” aleatoriamente independente da existência de sítios vizinhos energeticamente mais ativos.

As colunas formadas e o expoente de rugosidade crescem livremente de forma que o sistema não atinge o estado de saturação. Consequentemente, o expoente de rugosidade não pode ser determinado (BRITO, 2012; DE SOUZA, 2002). A FIGURA 12 mostra um esquema do como ocorre esse tipo de deposição.

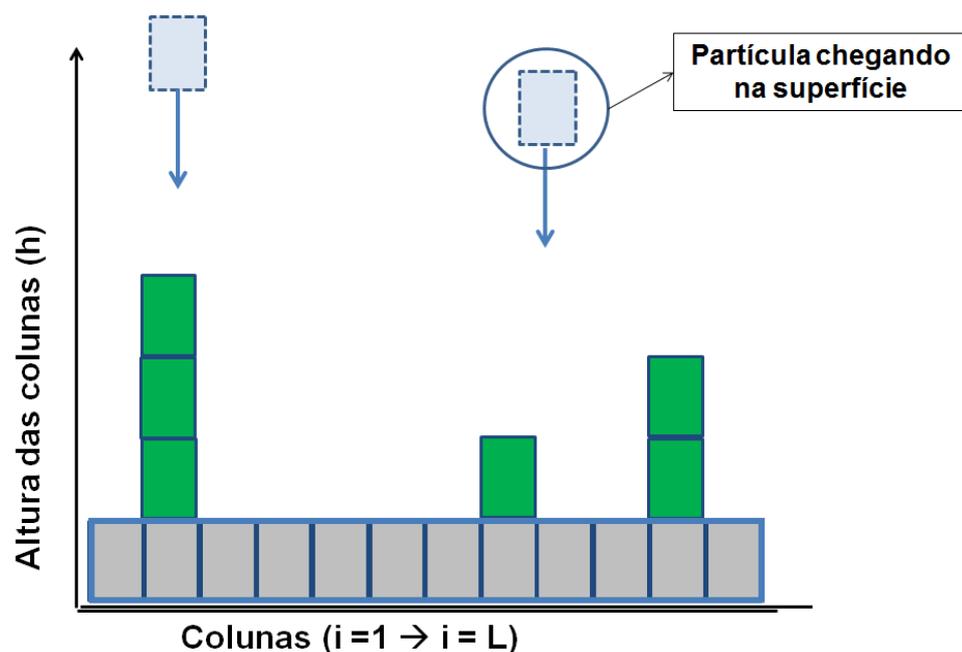


FIGURA 12 – Esquema representando o modelo de deposição aleatória.

Para descrever o processo de crescimento de uma superfície por DA, podem ser utilizadas equações diferenciais estocásticas desprezando detalhes de comprimentos de escalas curtos e observando as propriedades de coalescências de grãos. A equação (2.9) mostra como a altura da coluna varia com o tempo numa determinada posição x :

$$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = \phi + F(x,t) \quad (2.9)$$

sendo ϕ o número médio de partículas depositadas no sítio x e o segundo termo, $F(x, t)$, consiste na flutuação aleatória no processo de deposição (BARABÁSI; STANLEY, 1995; DE SOUZA, 2002).

2.4.3 Deposição aleatória com relaxação de superfície

Nos modelos de deposição que envolve relaxação de superfície, as partículas depositadas difundem por uma distância finita parando na posição de menor altura. Deposições com essa característica tendem a formar superfícies mais lisas quando comparados ao modelo de DA. A FIGURA 13 mostra um esquema de como ocorre esse tipo de deposição.

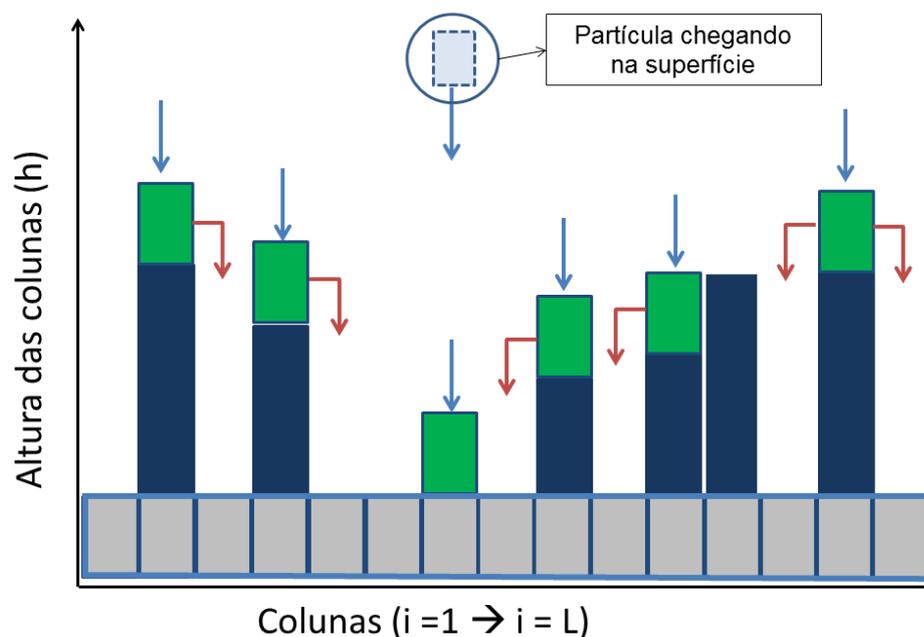


FIGURA 13 – Esquema representando o modelo de deposição aleatória com relaxação de superfície.

A equação diferencial estocástica que descreve a dinâmica do modelo com relaxação de superfície é dada por:

$$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = \lambda \nabla^2 h + \phi + F(x,t) \quad (2.10)$$

O primeiro termo no segundo membro foi incluído $\lambda \nabla^2 h$ para indicar a suavização da superfície. λ é um coeficiente relacionado a tensão de superfície (BARABÁSI; STANLEY, 1995; DE SOUZA, 2002).

2.4.4 Deposição balística (DB) e a equação de Kardar-Parisi-Zhang

Sistemas formados pela agregação de colóides podem ser estudados pelo modelo de deposição balística. O modelo consiste na deposição de diversas partículas sobre o substrato. Durante a deposição essas partículas podem interagir com outras partículas laterais já agregadas gerando superfícies com sítios vazios. Conforme discutido anteriormente, no modelo com relaxamento as partículas difundem pela superfície para fixar no ponto com mais baixa altura, enquanto no modelo balístico as partículas se ligam com a primeira partícula que encontram. Isso caracteriza crescimento lateral da superfície (DE SOUZA, 2002). A FIGURA 14 apresenta um esquema do modelo de deposição balística.

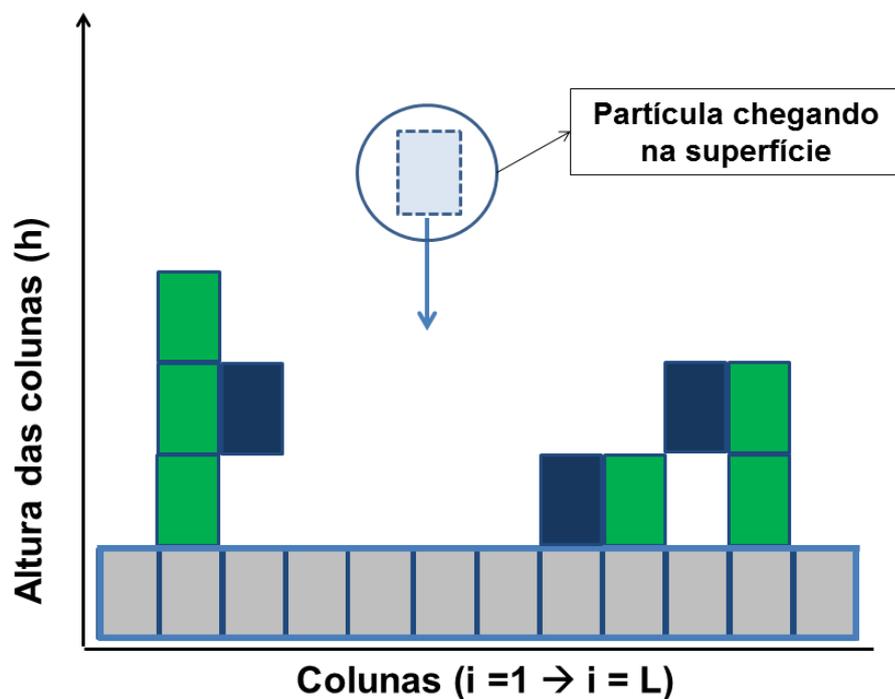


FIGURA 14 – Esquema representando o modelo de deposição balística.

A equação estocástica desenvolvida por Kardar-Parisi-Zhang (KPZ) inclui o termo não linear $\frac{\lambda}{2} (\nabla h)^2$ que se refere ao crescimento lateral da interface (BARABÁSI; STANLEY, 1995; DE SOUZA, 2002):

$$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = \lambda \nabla^2 h + \frac{\lambda}{2} (\nabla h)^2 + \phi + F(x,t) \quad (2.11)$$

2.4.5 Deposição via epitaxia por feixe molecular (MBE)

No sistema de deposição via epitaxia por feixe molecular (molecular beam epitaxy, MBE) as partículas são arranjadas aleatoriamente ligando-se a superfície. A desorção compete com esse fenômeno durante o crescimento e depende dos tipos de ligações que foram realizadas e da geometria local da interface. No modelo MBE as partículas difundem pela superfície buscando uma posição mais estável conforme ilustrado pela FIGURA 15 (BARABÁSI; STANLEY, 1995).

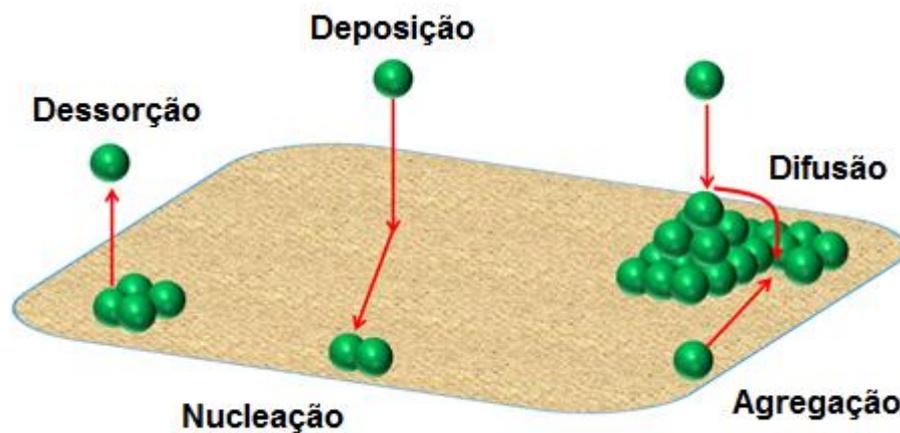


FIGURA 15 – Esquema representando o modelo MBE [Adaptado de (BARRON, 2009)].

A equação diferencial estocástica que descreve a formação da interface é dada por (BARABÁSI; STANLEY, 1995):

$$\frac{\partial h}{\partial t} = -K\nabla^4 h + \eta(x, t) \quad (2.12)$$

sendo K a representação da difusão na superfície. O termo $-K\nabla^4 h$ descreve o relaxamento da superfície e $\eta(x, t)$ representa a flutuação aleatória que ocorre durante a deposição.

Se a difusão dominar o crescimento e o processo de relaxação for relevante na formação da superfície a equação de crescimento será dada por:

$$\frac{\partial h}{\partial t} = -K\nabla^4 h + \lambda\nabla^2 (\nabla h^2) + \eta(x, t) \quad (2.13)$$

O termo $\lambda \nabla^2 (\nabla h^2)$ está relacionado à probabilidade das estruturas difundirem para posições energeticamente mais estáveis e sua relevância no processo de crescimento aumenta com a temperatura. Esta equação prevê a descrição da morfologia e dinâmica da interface em grandes comprimentos de escala e para longos tempos de observação podendo ser utilizada, portanto na análise do crescimento das colônias.

Uma das vantagens da utilização de leis de escala e análise dos modelos de crescimento em superfícies fractais é a aplicação na investigação do padrão morfológico de colônias e o comportamento dos contornos frente à variação temporal. Por exemplo, a investigação do crescimento de colônias *in vitro* e o desenvolvimento de tumores *in vivo* exibem a mesma dinâmica de formação, independente do tipo de célula analisada (BRÚ et al., 2003). O mecanismo responsável pela progressão das células tumorais pode estar associado com a difusão de células através das bordas do tumor, de modo que o conhecimento e o controle da fractalidade das colônias pode ser um fator importante a ser considerado. Uma maneira de provocar alteração no contorno de bordas das colônias é o uso de fotossensibilizadores associados a uma fonte de luz.

2.5 Inativação fotodinâmica

A inativação fotodinâmica, IFD, é um procedimento que visa eliminar um patógeno, e envolve a associação de um fotossensibilizador, FS, excitado por uma fonte de luz com comprimento de onda específico. Essa associação pode ocasionar a morte celular por intermediários citotóxicos do oxigênio molecular ou outros radicais livres que estão presentes nos tecidos biológicos (ACKROYD et al., 2001; CHOI et al., 2010; GAD et al., 2004; GORZA, 2014; HAMBLIN; HASAN, 2004; KESSEL, 2004; MACHADO, 2000; MAISCH, 2007; MELO; PERUSSI, 2012; MROZ et al., 2010; TRESCHER, 2014). Os produtos resultantes da combinação do FS e o oxigênio molecular podem danificar a membrana e/ou a parede celular de um microrganismo, causando sua morte (GORZA, 2014).

A IFD está sendo investigada não somente em aplicações clínicas, mas também nas áreas ambientais como, por exemplo, em processos de

desinfecção de água (ALMEIDA et al., 2009) e eliminação de conídios de fungos *Colletotrichum acutatum* e *Aspergillus nidulans* (DE MENEZES et al., 2014a).

2.5.1 Mecanismo de inativação fotodinâmica

As reações de fotossensibilização envolvidas na inativação de um microrganismo podem ser explicadas através da representação esquemática mostrada na FIGURA 16.

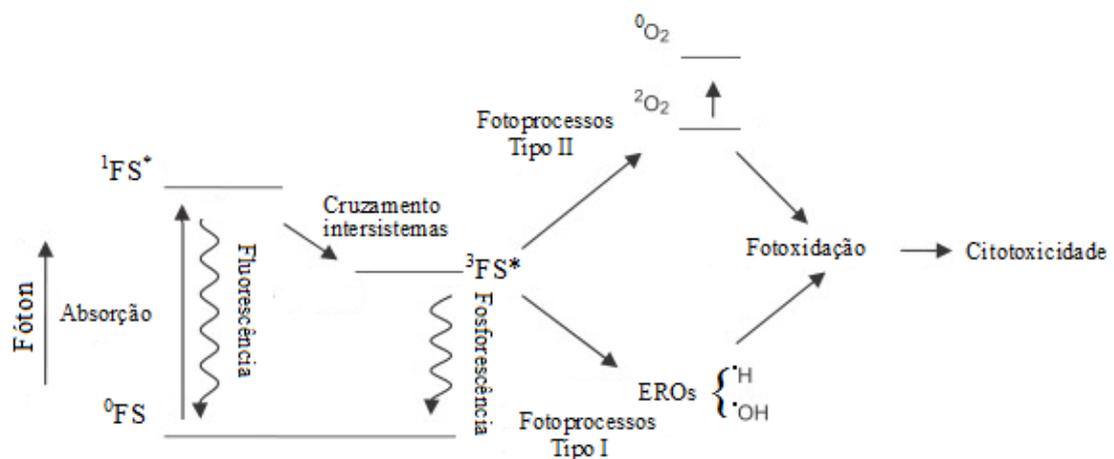


FIGURA 16 – Esquema das etapas fotoquímicas e fotofísicas envolvidas na fotossensibilização [Adaptado de (KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002; RODRIGUES, 2012)].

Durante a irradiação, o FS é excitado e sofre uma transição do estado fundamental, de baixa energia (^0FS) para o estado excitado singleto de curta duração ($^1\text{FS}^*$) (HAMBLIN et al., 2002; KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002). O FS pode voltar ao estado fundamental por vários processos radiativos (fluorescência, fosforescência) ou não radiativos (interconversão e cruzamento intersistemas) (DE MENEZES, 2012; DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008). Por meio do processo de cruzamento intersistemas, a molécula do FS pode passar do estado singleto de curta duração ($^1\text{FS}^*$) para o estado excitado tripleto de vida longa ($^3\text{FS}^*$) (HAMBLIN et al., 2002; KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002). O principal papel do estado singleto no processo de fotossensibilização é atuar como um precursor do estado tripleto. Este estado tripleto é o estado fotoativo, e que pode gerar espécies citotóxicas, passando por duas reações principais

(KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002). Essas reações são conhecidas como fotoprocessos do Tipo I e do Tipo II. Ambos os processos necessitam de oxigênio para ocorrerem (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; HAMBLIN et al., 2002). O fotoprocisso do Tipo I ocorre pela transferência de elétrons entre o estado tripleto do FS e um substrato, produzindo assim radicais iônicos que podem reagir com o oxigênio, resultando em espécies reativas de oxigênio, EROs, espécies citotóxicas, como o superóxido e hidroxila. O fotoprocisso do Tipo II necessita de um mecanismo de transferência de energia do estado tripleto do FS para o oxigênio molecular, que ocupa normalmente o estado fundamental tripleto, 2O_2 , ocasionando assim a geração de oxigênio singleto no estado excitado, que é capaz de oxidar e danificar de forma irreversível diversas biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, levando à citotoxicidade (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008; HAMBLIN et al., 2002; KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002; MACHADO, 2000; MROZ et al., 2010).

Os mecanismos que envolvem os fotoprocessos do tipo I e II podem ocorrer simultaneamente, e a razão entre ambos depende de diversos parâmetros, principalmente às características e propriedades físico-químicas do FS, concentração de substrato e oxigênio, assim como a afinidade de ligação do FS com o substrato (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008; KALKA; MERK; MUKHTAR, 2000; SILVA et al., 2015).

2.5.2 Fontes de Luz

A escolha de uma fonte de luz apropriada para excitar o FS é importante e garante uma melhor eficácia no processo (GORZA, 2014). Na terapia fotodinâmica com ênfase no tratamento clínico busca-se fontes de luz que esteja na faixa de 600 a 800 nm, região conhecida como janela terapêutica e quanto maior o comprimento de onda maior será a penetração no tecido (BAGNATO, 2008; RIBEIRO; FLORES, 2005; SILVA; BORISSEVITCH, 2010). Entre as fontes de luz utilizadas destacam-se a luz laser, LEDs (diodo emissor de luz), lâmpada fluorescente e luz branca, entre

outras (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010; MACHADO, 2000; TOREZAN; NIWA; NETO, 2009). No entanto, no controle de fitopatógenos, é interessante o uso de luz solar (ALMEIDA et al., 2009; DE MENEZES, 2012).

A radiação ultravioleta é a parte do espectro eletromagnético, referente aos comprimentos de onda entre 100-400 nm que é dividido em três faixas: UVA (315-400 nm); UVB (280-315 nm); UVC (100-280 nm) (INPE, 2016a; WHO, 2002, 2007). No entanto a radiação ultravioleta que atinge a superfície do planeta é em grande parte composta de UVA e frações de UVB, pois como a luz solar passa através da atmosfera, praticamente toda a radiação UVC e boa parte da radiação UVB são absorvidos pelo ozônio, vapor de água, oxigênio e dióxido de carbono (INPE, 2016a; JUCHEM et al., 1998; WHO, 2002).

2.5.2.1 Índice de Ultravioleta

O Índice Ultravioleta, IUV, é uma medida amplamente utilizada na taxa de exposição à radiação ultravioleta (WHO, 2007). O IUV está relacionado aos níveis de irradiação ultravioleta que induzem à formação de eritemas na pele humana e é determinado a partir da Irradiância Eritêmica (LEAL; TIBA; PIACENTINI, 2010; WHO, 2002), sendo definida por uma superfície horizontal irradiada pela luz solar.

As irradiâncias espectrais sofrem influência de alguns fatores como quantidade de ozônio, posição geográfica da localidade, tipo e altitude da superfície, estação do ano, hora do dia e condições atmosféricas (INPE, 2016b).

Essa irradiância espectral é ponderada pela resposta da pele humana à radiação ultravioleta, formulada segundo a norma da CIE (*International Commission on Illumination*), denominada Irradiância Eritêmica (DOS SANTOS; DA SILVA; MARINHO, 2011; INPE, 2016b; WHO, 2002, 2007). Matematicamente o IUV é uma quantidade adimensional representada pela integral no intervalo espectral entre 280 e 400nm (UVB e UVA):

$$IUV = C \int_{280nm}^{400nm} E_{\lambda} \varepsilon_{\lambda} d\lambda \quad (2.14)$$

sendo E_{λ} a irradiância espectral na superfície (Wm^{-2}/nm), ε_{λ} o espectro de ação eritêmica e C uma constante de conversão equivalente a 40 Wm^{-2} . Desse modo, o IUV é uma representação da Irradiância Eritêmica, em um formato mais simplificado (INPE, 2016b) ou seja uma padronização da Irradiância Eritêmica através de uma escala numérica como representado na FIGURA 17 (DA SILVA; OLIVEIRA; MARINHO, 2008; DOS SANTOS; DA SILVA; MARINHO, 2011).

Categoria	Índice Ultravioleta
Baixo	<2
Moderado	3 a 5
Alto	6 a 7
Muito alto	8 a 10
Extremo	>11

FIGURA 17 – Categorias de intensidades de IUV [Adaptado de(INPE, 2016b)].

O IUV é representado por um número inteiro, sendo considerado baixo para um valor < 2 e extremo para um valor > 11 e cada unidade de IUV corresponde a 25 mWm^{-2} de energia (DOS SANTOS; DA SILVA; MARINHO, 2011; INPE, 2016b; LEAL; TIBA; PIACENTINI, 2010; WHO, 2002, 2007).

2.5.3 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores, FSs, são moléculas capazes de interagir com a luz de modo a gerar espécies altamente reativas de oxigênio (DA SILVA, 2007), e devem possuir comportamento inativo em seu estado fundamental, absorver luz, exibir comportamento ativo durante o processo fotodinâmico e devem ser atóxicos ou apresentar baixa toxicidade (DOUGHERTY, 1993; JORI et al., 2006). Um FS, considerado ideal para inativação de microrganismos, deve ser quimicamente puro, acumular-se seletivamente nos microrganismos alvos, ser ativado por fontes de luz e apresentar alta eficiência quântica para o evento fotoquímico (ACKROYD et al., 2001; ALMEIDA et al., 2009; JORI et al., 2006), sendo a eficiência

quântica uma medida da fração dos fótons absorvidos que participam da fotoquímica (TAIZ et al., 2017).

A primeira utilização de FS na ação fotodinâmica foi relatada por Oscar Raab em 1900, descobrindo que a combinação do corante laranja de acridina e luz, apresentava um efeito letal sobre a *Infusoria*, uma espécie de paramécio (ACKROYD et al., 2001; AMADO, 2013; KESSEL, 2004).

2.5.3.1 Laranja de Acridina

O laranja de acridina, LA, representado na FIGURA 18 é um corante catiônico com peso molecular de 265 gmol^{-1} e volume molar 227 cm^3 (AMADO, 2013; CHEMSPIDER, 2016; SIGMA-ALDRICH, 2016), solúvel em água, e pertence à família das Acridinas, possui características únicas que o permitem ser usado em diversas aplicações tanto na medicina, biologia quanto em diversas áreas técnicas (AMADO, 2013).

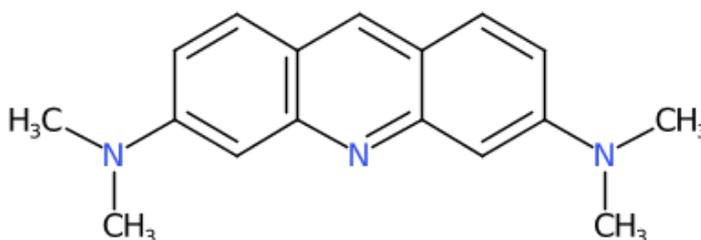


FIGURA 18 – Representação da estrutura molecular do LA [Adaptado de (AMADO, 2013)].

Uma de suas principais utilizações é na microscópica de fluorescência para marcação e detecção de microrganismos (ACKERMAN; SHEMESH, 1964; AMADO, 2013; BI et al., 2006; PRAKASH et al., 2011; STRUGGER, 1948; TRESCHER, 2014; VON BERTALANFFY; BICKIS, 1956). Além disso, apresenta atividade antitumoral (KUSUZAKI et al., 2007a; TOMSON; EMMETT; FOX, 1974), fototoxicidade contra bactérias, parasitas e fungos (KUSUZAKI et al., 2007b; RICKMAN et al., 1989; ZAMPIERI; GREENBERG, 1965) e também é usado como sonda óptica para monitorar gradiente de pH em sistemas biológicos através da membrana (PALMGREN, 1991).

O LA é um FS utilizado em terapia fotodinâmica (HORI et al., 2014; ROMIO, 2015; SATONAKA et al., 2011; TOMSON; EMMETT; FOX, 1974) e mostrou-se eficaz na inativação fotodinâmica de *Candida albicans* (DOS SANTOS et al., 2016), *Escherichia coli* (HASS; WEBB, 1981) e em linhagem de células tumorais multirresistente (KUSUZAKI et al., 2000).

A FIGURA 19 mostra que o LA apresenta cinco picos característicos na região do ultravioleta-visível (UV-Vis): 230nm, 270nm, 290nm, 470nm (forma monomérica) e 490nm (dímeros). Os três primeiros são referentes a transição do estado fundamental S_0 para segundo estado excitado singlete S_2 (transição $S_0 \rightarrow S_2$), enquanto que os dois últimos correspondem a transição $S_0 \rightarrow S_1$ (AMADO, 2013).

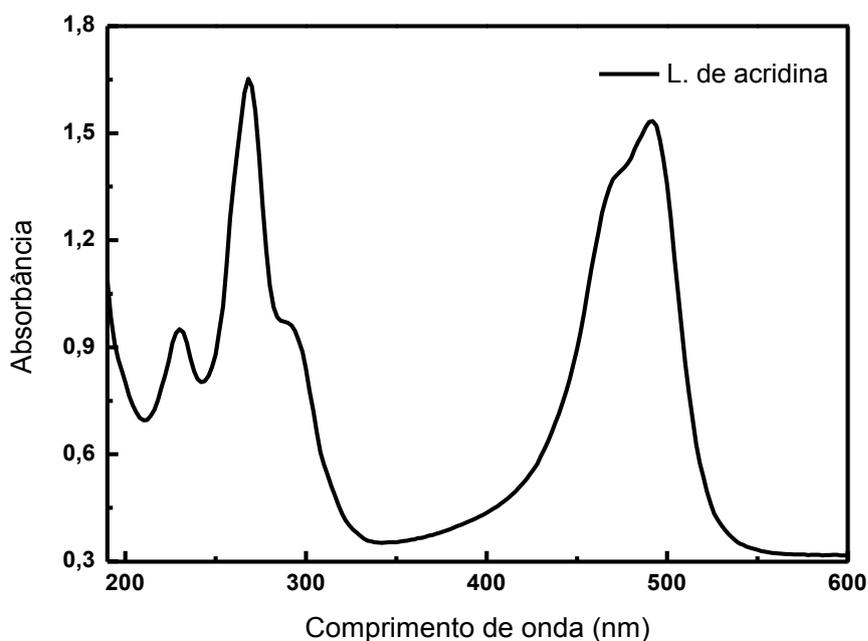


FIGURA 19 – Espectro de UV-Vis da solução de laranja de acridina.

2.6 Técnica de deposição de FS

A técnica de deposição camada por camada, *layer-by-layer*, LbL, é baseada na adsorção espontânea de espécies carregadas em solução para um substrato sólido. Na maioria dos casos o mecanismo responsável pela adsorção é a interação iônica, originada por interações eletrostáticas (BRITO, 2012; DECHER, 1997). A técnica LbL, consiste em mergulhar um substrato em solução carregada positivamente, durante um determinado

intervalo de tempo. Em seguida, o substrato com a monocamada é enxaguado em uma solução aquosa e posteriormente seco em fluxo de ar. Novamente o substrato com a monocamada é mergulhado em outra solução, agora com moléculas carregadas negativamente, produzindo adsorção de uma segunda monocamada. Posteriormente o substrato com duas monocamada é enxaguado e seco em fluxo de ar novamente e ao final dessas duas etapas obtém-se a primeira bicamada de um filme automontado (BRITO, 2012; DE SOUZA, 2002; GORZA, 2014).

2.6.1 *Spray layer-by-layer*

Apesar da versatilidade da técnica LbL, ela apresenta algumas limitações práticas, principalmente com relação aos longos períodos de tempo para a completa adsorção das camadas e a pequena área de recobrimento (AOKI, 2014). Essas limitações foram finalizadas como uma nova abordagem da técnica proposta por Schlenoff e colaboradores (SCHLENOFF; DUBAS; FARHAT, 2000). Nesse novo enfoque as soluções são pulverizadas através de *spray*, de forma alternada sobre a superfície de um substrato, como representado na FIGURA 20. Esse processo foi denominado como *spray-LbL*. (FUKAO et al., 2011; IZQUIERDO et al., 2005; KROGMAN et al., 2007).

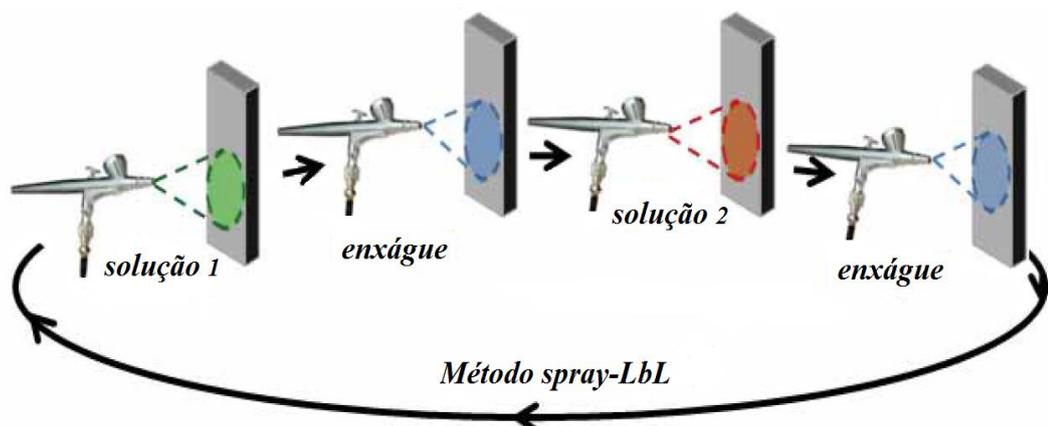


FIGURA 20 – Metodologia aplicada na fabricação de filmes *spray-LbL* [Adaptado de (AOKI, 2014; AOKI et al., 2012)].

Esse método tem uma ampla gama de aplicações tais como em filmes de polieletrólito de vesículas de fosfolípidios incorporados em PGA/PAH (MICHEL et al., 2005), filmes poliméricos (BRUENING; DOTZAUER, 2009), além de várias classes de materiais, como filmes inorgânicos (POPA et al., 2010) e de materiais orgânicos, para aplicação em células solares (KIM et al., 2012), na fabricação de filmes finos de nanotubos de carbono (KUMAR et al., 2010; LIU et al., 2010) e de grafeno (PHAM et al., 2010) e na inativação fotodinâmica de microrganismos (DOS SANTOS et al., 2016).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fotossensibilizador Laranja de Acridina

O corante LA, obtido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) foi utilizado como FS para os testes de IFD em concentração de 0,25 gL⁻¹. A solução foi preparada utilizando água purificada em sistema de osmose reversa da Quimis® Q842-210.

3.2 Estimativa da Dose através do IUV

A irradiância eritêmica acumulada em um intervalo de tempo Δt é denominada Dose (J/m²) e pode ser definida como:

$$Dose = IUV_{méd} \cdot i_v \cdot \Delta t \quad (3.1)$$

sendo i_v , o valor de uma unidade de IUV, correspondente a 25 mWm⁻², e $IUV_{méd}$ a média do Índice de Ultravioleta no intervalo de tempo, Δt . Embora o IUV esteja relacionado aos níveis de irradiação ultravioleta que induzem à formação de eritemas na pele humana, neste trabalho utilizou-se o IUV, na quantificação de energia solar para a determinação da Dose.

Os dados de IUV foram obtidos através do *site* do INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais) <http://www.cptec.inpe.br/cidades/tempo/761> e <http://satelite.cptec.inpe.br/uv/>.

3.3 *Spray-LbL*

O método *spray-LbL* foi utilizado para depositar o FS LA sobre as superfícies das colônias de alga e antracnose. Utilizou-se um aerógrafo *airbrush* modelo BD-137, com agulha de 0,2 mm de diâmetro e copo para

fluido de 2 mL, acoplado a um compressor de 300psi (12V), alimentado por uma bateria heliar DTZ6 como mostra o esquema da FIGURA 21. A deposição ocorreu na direção perpendicular com distância de 8 cm entre o eixo do *spray* e a folha.

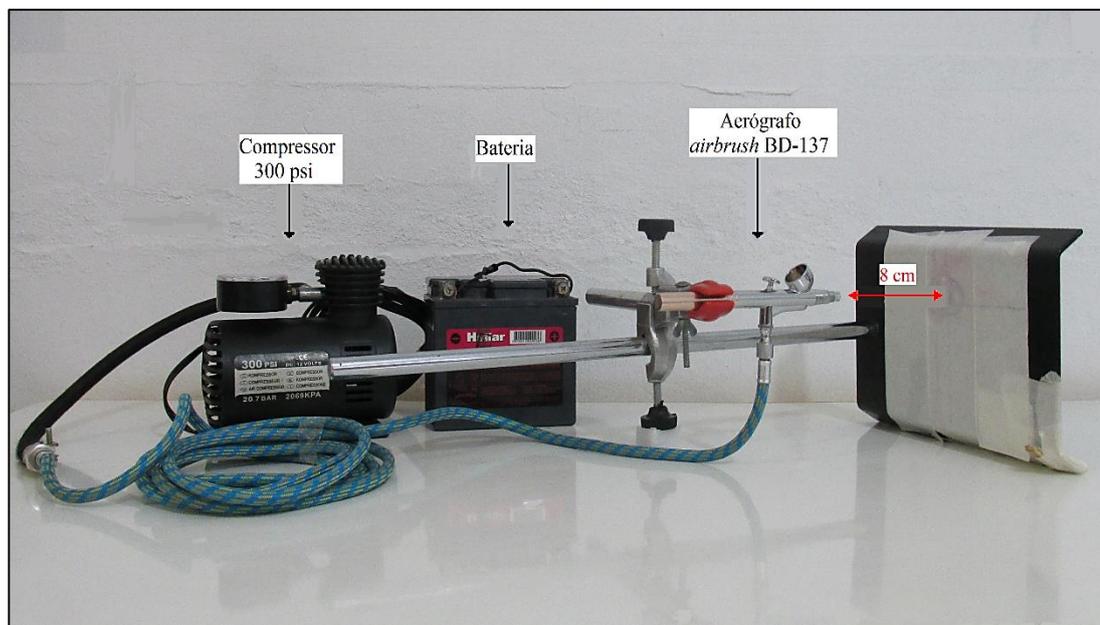


FIGURA 21 – Fotografia do sistema experimental utilizado na deposição do FS, sobre a superfície das folhas de goiabeira e cajueiro.

Todos os procedimentos de aplicação do FS foram realizados adotando uma pressão de 20 psi, pelo menor tempo de pressionamento do gatilho de liberação.

3.4 Análise da dinâmica de crescimento das colônias

Folhas de cajueiro infectadas com antracnose e de goiabeira com mancha de alga foram analisadas neste trabalho. As colônias foram identificadas no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT/CUA). O acompanhamento foi realizado no campus da Universidade Federal de Mato Grosso, município de Barra do Garças/MT, no período de 28 de Junho a 09 de setembro de 2016. O crescimento das colônias foram, acompanhado através de registro fotográfico em intervalos de 24h, utilizando uma câmera digital Canon PowerShot SX170 IS (16.0MP).

3.5 Processamento de imagens

A cada 24h, as colônias de antracnose e alga foram fotografadas e as imagens arquivadas. Para realizar o processamento de imagens digitais, utilizou-se o software livre *ImageJ*. Sendo esse software desenvolvido pela *National Institutes of Health* e a versão utilizada foi a 1.49 (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). A FIGURA 22 é uma representação do ambiente de processamento de imagens do programa *ImageJ*. O programa encontra-se disponível para *download* em <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>.

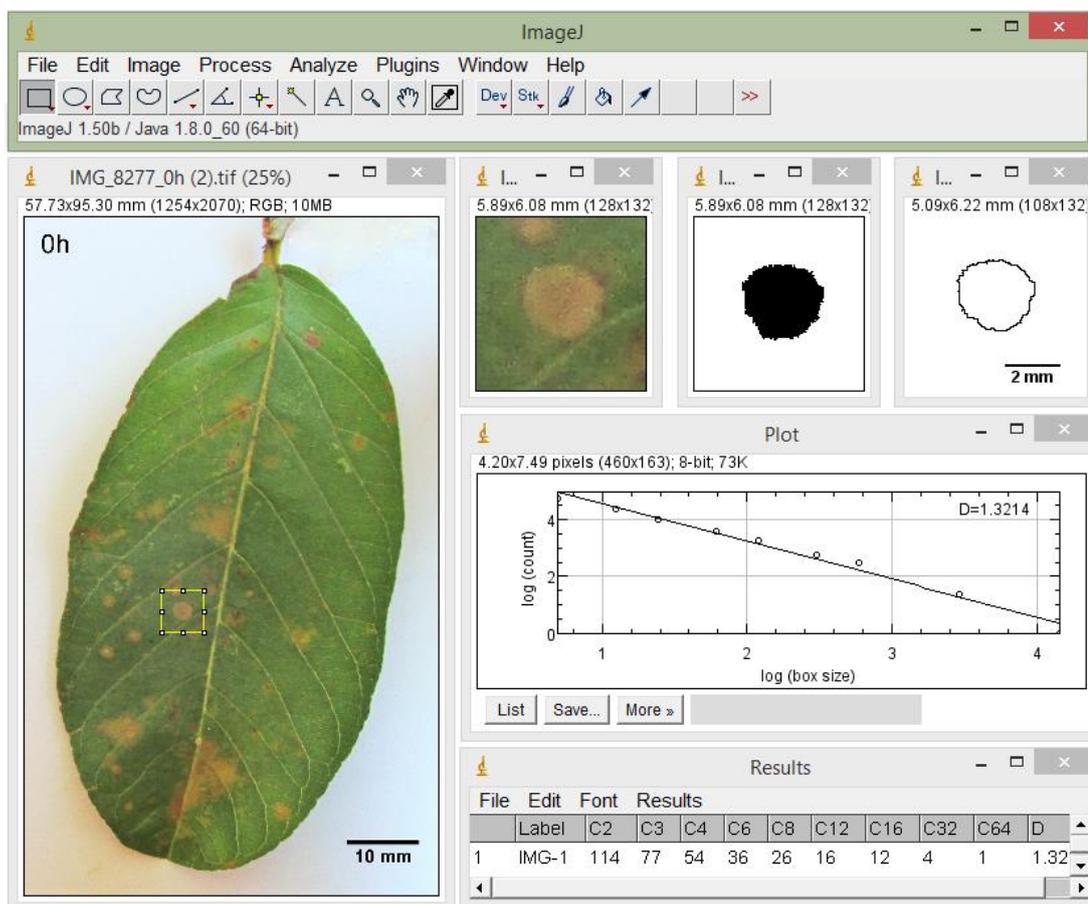


FIGURA 22 – Representação do ambiente de processamento e análise de imagens utilizando o software *ImageJ*.

O método para determinação da dimensão fractal é adequado apenas para imagens binárias, a técnica de binarização proporciona a separação da imagem completa nas partes que as constituem e que se diferenciam entre si (ESQUEF; DE ALBUQUERQUE; DE ALBUQUERQUE, 2003), de modo

que as cores das imagens não são importantes para a análise, assim processa apenas informações em escala de cinza. As imagens foram limiarizadas, e separadas em dois grupos: um grupo com pixels em escala de cinza abaixo do limiar e outro com pixels em escala de cinza acima do limiar.

Logo, uma imagem limiarizada $g(x, y)$ é definida como:

$$g(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{se } f(x, y) > T \\ 0 & \text{se } f(x, y) \leq T \end{cases} \quad (3.2)$$

sendo $f(x, y)$ a imagem de entrada, T o valor do limiar.

Assim a imagem $g(x, y)$ será composta apenas por dois valores para cada pixel. Desta maneira informações referentes a folha ou qualquer tipo de contaminação podem ser removidas durante o tratamento, selecionando apenas as imagens referentes às colônias estudadas (TRESCHER, 2014). Após a binarização é necessário fazer a detecção das bordas, a qual é uma técnica que permite separar o grupo de pixels que delimitam os contornos ou bordas dos objetos a ser analisado (ESQUEF; DE ALBUQUERQUE; DE ALBUQUERQUE, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise do Índice de Ultravioleta e Aplicação do FS

As colônias de alga em folhas de goiabeira e as de antracnose em folhas de cajueiro, foram acompanhadas em grupos controles sem FS e grupos com aplicação de camadas de FS, denominados 1-LA para 1 camada aplicada, 5-LA para 5 camadas aplicadas e assim sucessivamente. A aplicação do FS foi realizada na face adaxial das folhas conforme descrito na seção 3.3. As FIGURAS 23 e 24 mostram exemplos de folhas escolhidas, que foram folhas adultas apresentando colônias em sua superfície adaxial.

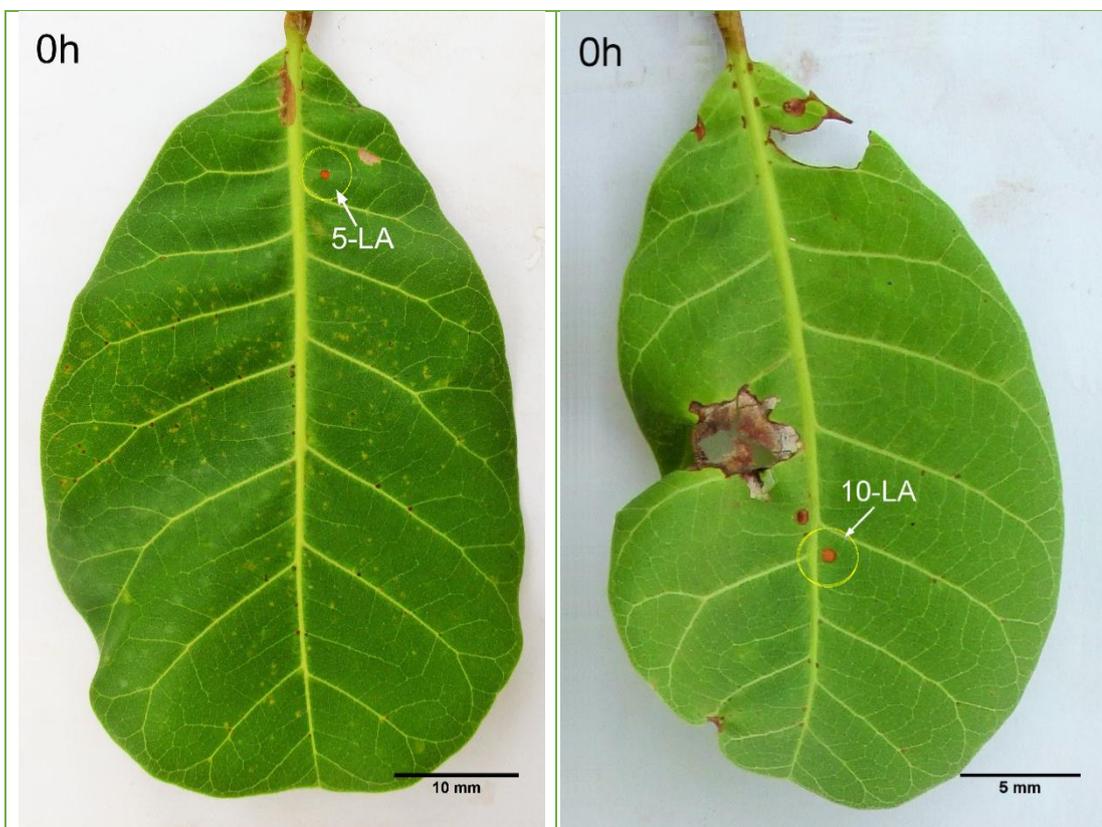


FIGURA 23 – Exemplos de folhas adultas de cajueiro utilizadas nos experimentos IFD e a localização das colônias de antracnose em sua superfície adaxial.

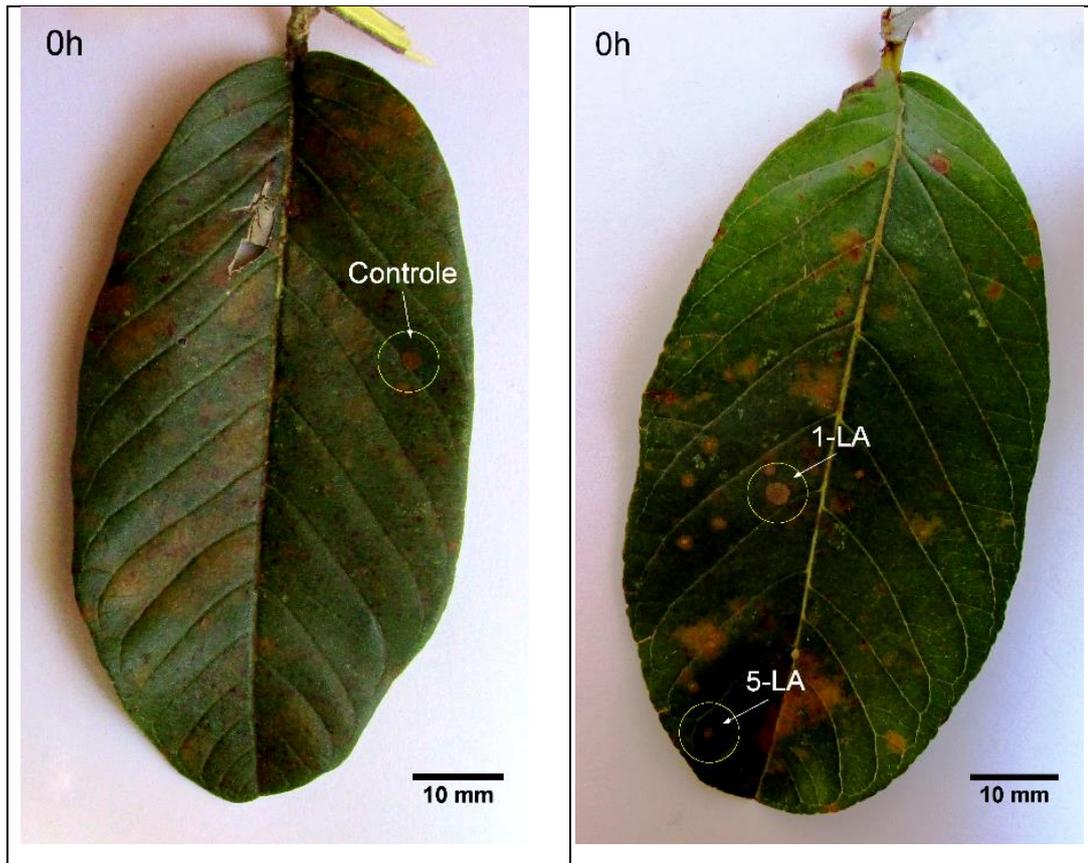


FIGURA 24 – Exemplo de folhas adultas de goiabeira utilizadas nos experimentos de IFD, e a localização das colônias de alga em sua superfície adaxial.

As aplicações do FS em colônias de alga foram realizadas as 10 horas do dia 19 de Julho de 2016 e as 10 horas do dia 17 de Agosto de 2016 em colônias de antracnose. Os índices de ultravioleta foram acompanhados rigorosamente, assim como a intensidade de radiação solar na superfície das folhas e os dados estão representados nas **FIGURAS 25** e **26** para mancha de alga e antracnose, respectivamente.

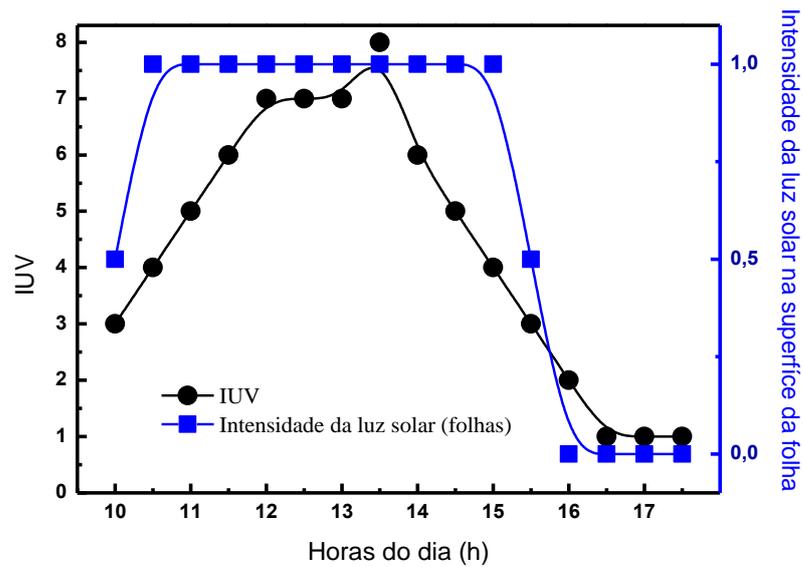


FIGURA 25 – Representação do IUV em função das horas do dia 19/07/2016 e a intensidade de luz solar na superfície (adaxial) das folhas de goiabeira, onde 0 representa a folha sem luz solar (sombra) e 1 representa a intensidade máxima da luz solar na superfície das folhas.

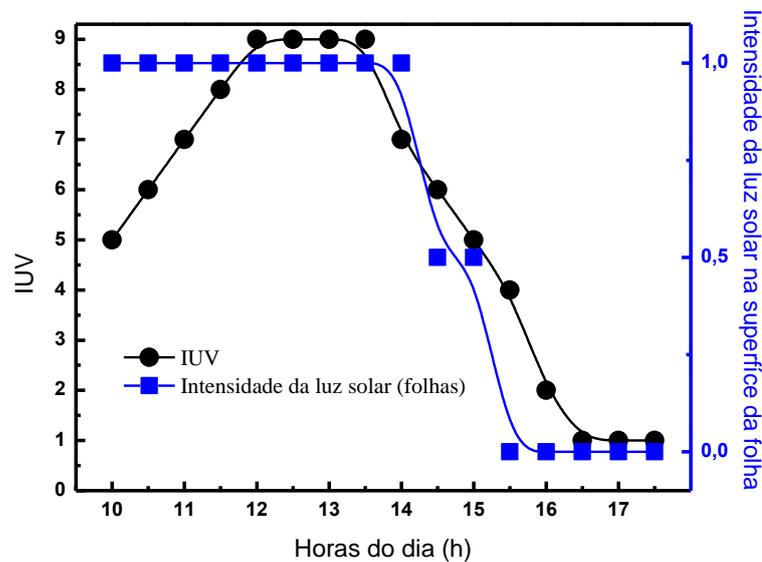


FIGURA 26 – Representação do IUV em função das horas do dia 17/08/2016 e a intensidade de luz solar na superfície (adaxial) das folhas de cajueiro (antracnose), onde 0 representa a folha sem luz solar (sombra) e 1 representa a intensidade máxima da luz solar na superfície das folhas.

Pela análise dos resultados das FIGURAS 25 e 26 é possível estimar o intervalo de tempo (Δt) que as folhas permaneceram em exposição à radiação ultravioleta, e o índice de ultravioleta médio ($IUV_{méd}$). Para colônias de alga, com os valores de $\Delta t = 16.200 \text{ s}$ e $IUV_{méd} = 5,9 \pm 1,4$ é possível

estimar a dose em $2.389,5 \pm 554,9 \text{ J/m}^2$ utilizando a equação (3.1). Em colônias de antracnose, $\Delta t = 14.400 \text{ s}$ e $IUV_{méd} = 7,7 \pm 1,5$ resulta em uma dose de $2.760,0 \pm 540 \text{ J/m}^2$. As folhas que foram escolhidas para acompanhamento permaneceram a maior parte do dia sob incidência direta do sol. Estes valores são similares aos registrados nos meses de Julho e Agosto de 2007 em Belo Horizonte (SILVA, 2008) e apresentam variabilidade na incidência da radiação que podem estar relacionadas a dependência do ozônio na atmosfera, da elevação solar máxima diária ao longo dos meses e da ação de nuvens.

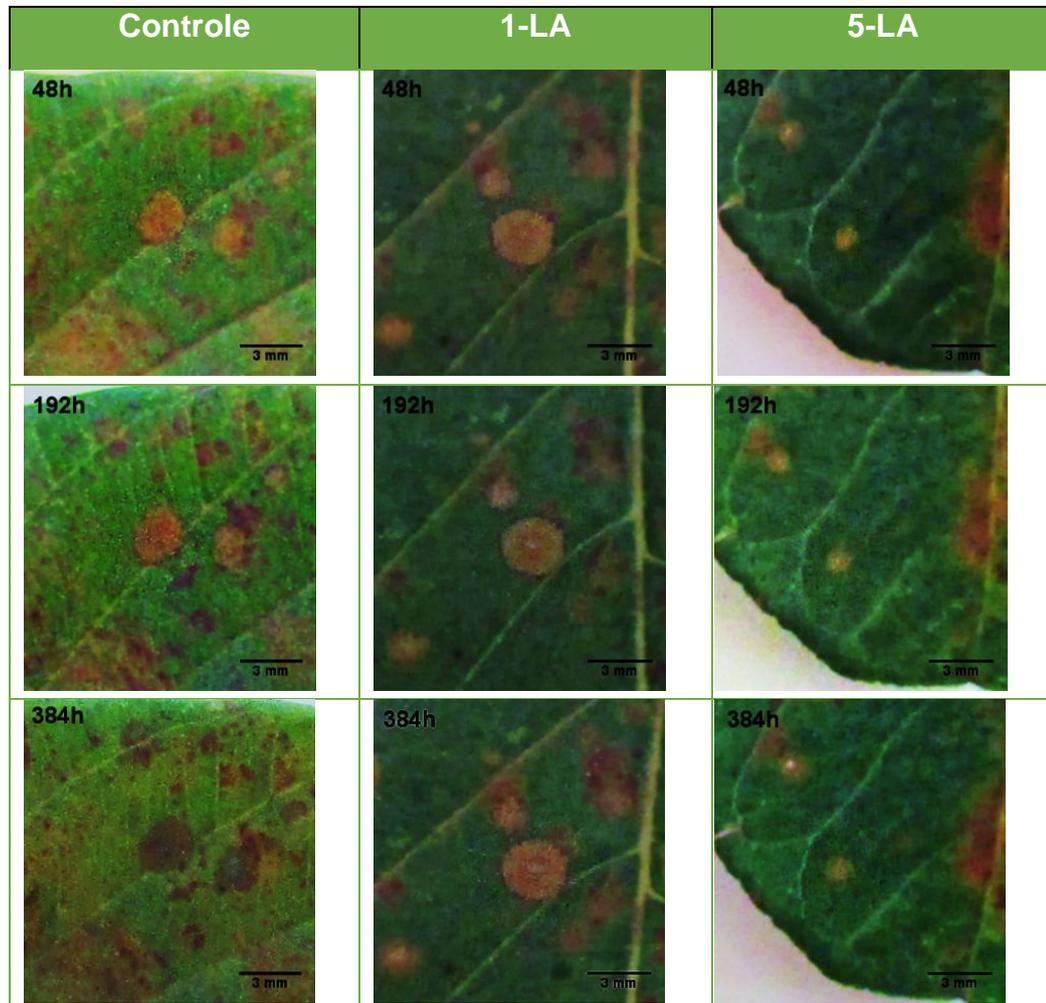
Após a aplicação do FS foi observado que este procedimento não gerou nenhuma lesão ou alteração morfológica, nas folhas de cajueiro ou goiabeira. Resultados semelhantes foram encontrados na aplicação de alguns FSs, em folhas de laranja pera e valência (*Citrus sinensis*) (DE MENEZES et al., 2014a; FRACAROLLI, 2015).

Em uma análise histológica de cortes transversais em folhas de laranja após a aplicação dos FSs fenotiazínicos (azul de metileno, novo azul de metileno N, azul de toluidina O e o novo fenotiazínico pentacíclico S137), mostraram que os corantes não atravessam a cutícula das folhas, sendo assim as células ficam suficientemente distantes do FS, e portanto não são danificadas pelas espécies reativas de oxigênio produzidas durante o mecanismo de IFD (DE MENEZES, 2012). Este resultado indica que a aplicação do FS não deve causar danos na estrutura das folhas.

4.2 Dinâmica de crescimento

A dinâmica de crescimento das colônias foi analisada acompanhando a evolução temporal da formação das colônias, na presença de frações aplicadas do FS laranja de acridina, utilizando a técnica de *spray-LbL*. Os dados foram analisados a luz da teoria fractal, que pode indicar os mecanismos responsáveis pela reprodução e difusão dos microrganismos (TRESCHER, 2014).

A evolução morfológica e a análise de contornos das colônias de alga foram morfometricamente avaliadas através de imagens fotográficas como apresentado na [FIGURA 27](#).



[FIGURA 27](#) – Influência da quantidade de camadas de FS, na evolução temporal do crescimento do padrão de colônias de alga. As barras de escala correspondem a 3mm.

O comportamento investigado foi a dependência do crescimento radial das colônias em função do número de camadas de FS aplicado em campo, frente a radiação solar. A [FIGURA 28](#) mostra algumas imagens binarizadas do contorno das colônias de alga, correspondentes a diferentes tempos de observação analisados. Análise semelhante foi realizada para colônias de antracnose ([FIGURAS 29 e 30](#)).

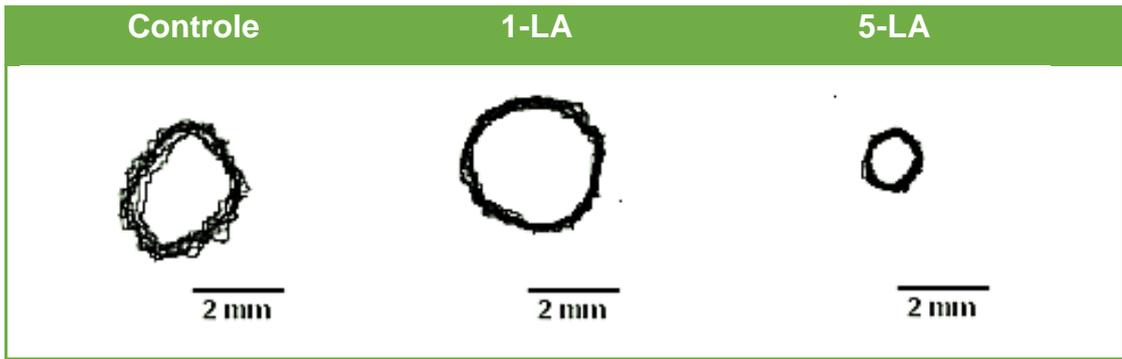


FIGURA 28 – Evolução temporal do contorno das colônias de alga. Cada contorno corresponde a um tempo de captura das imagens do crescimento das colônias.

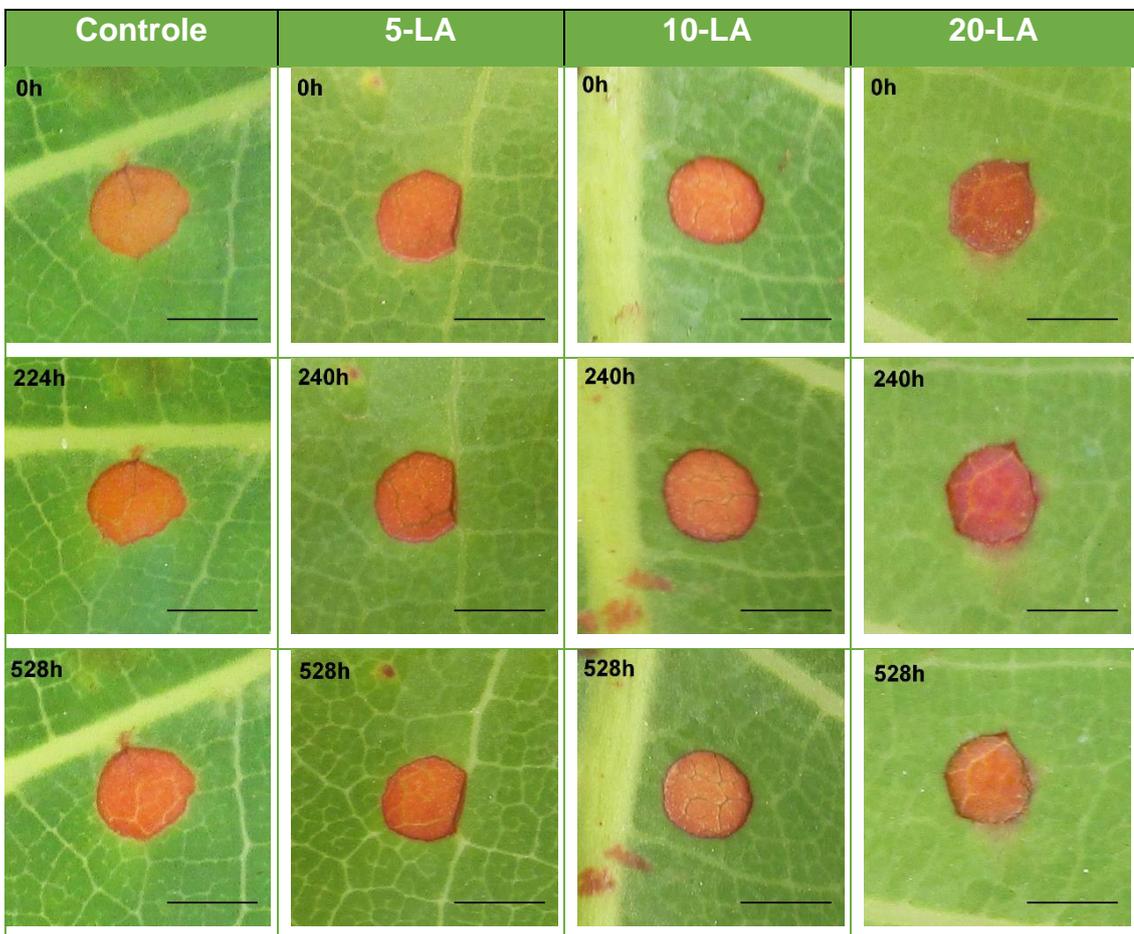


FIGURA 29 – Influência da quantidade de camadas de FS, na evolução temporal dos padrões de crescimento das colônias de antracnose. As barras de escala correspondem a 2mm.

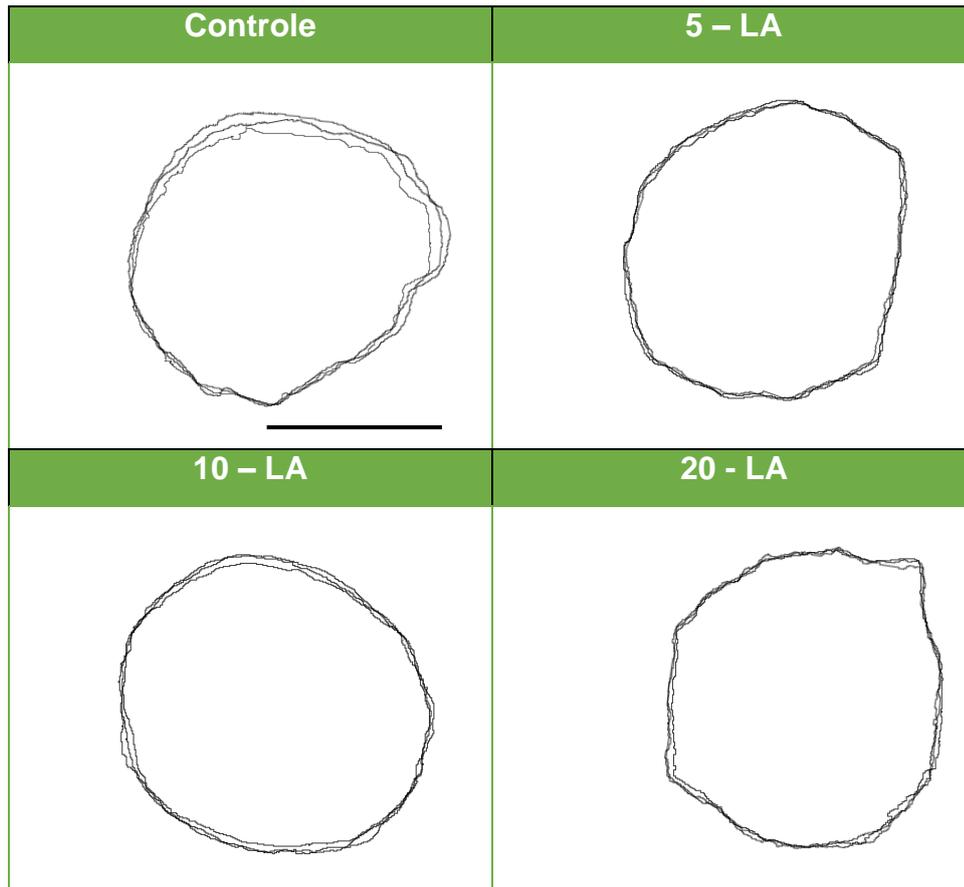


FIGURA 30 – Evolução temporal do contorno das colônias de antracnose. Cada contorno corresponde a um tempo de captura das imagens do crescimento das colônias. A barra de escala corresponde a 2mm.

Foi possível observar que a expansão radial das colônias com FS sofre uma menor alteração em comparação com os grupos controle. O gráfico da **FIGURA 31** representa mais claramente essa diferença em colônias de alga que foram acompanhadas antes e depois da deposição do FS. Na **FIGURA 31** o grupo controle representa colônias sem FS, enquanto a outra curva é uma junção do resultado de observação de colônias antes e após a aplicação de uma camada de LA. O resultado mostra que o crescimento das colônias após deposição do FS tende a um patamar de saturação, ou seja, o crescimento parece estar sendo descontinuado. Este é um resultado interessante, visto que indica que a ação do FS juntamente com a radiação solar parece reduzir a velocidade de crescimento das colônias.

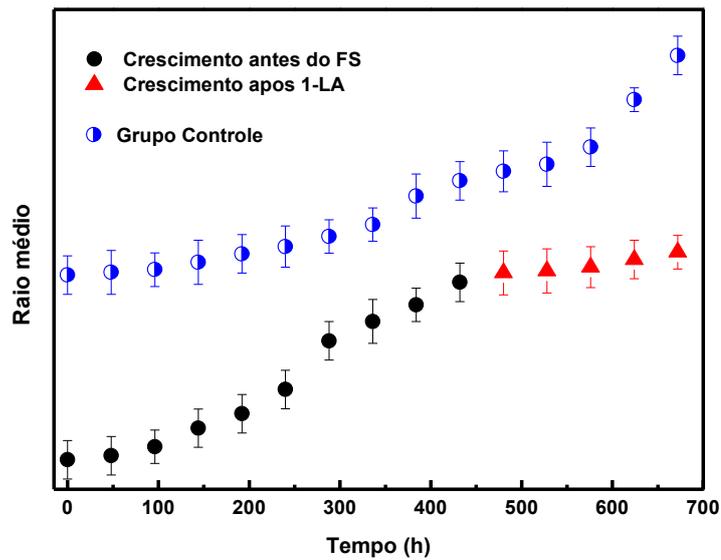


FIGURA 31 – Acompanhamento da expansão radial de colônias de alga. O grupo controle corresponde a colônias sem FS. A outra curva é uma composição da observação das colônias antes e após aplicação do FS.

4.2.1 Velocidade de crescimento das colônias

A cinética de crescimento do microrganismo pode ser analisada através do estudo da dependência do raio médio das colônias em função do tempo. A taxa de expansão radial ou velocidade de crescimento radial, V_{cres} , das colônias podem ser estimadas através do declive dos gráficos como exemplificado na FIGURA 32 para colônias de alga e para antracnose (FIGURA 33).

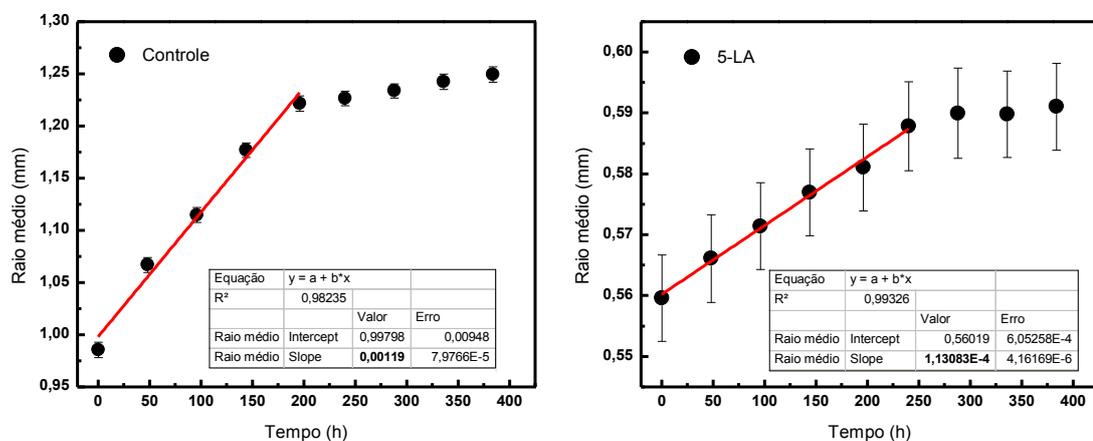


FIGURA 32 – Gráficos do raio médio em função do tempo de acompanhamento das colônias de alga: grupos controle e 5-LA. Nos detalhes das figuras, os ajustes correspondentes a região linear do gráfico.

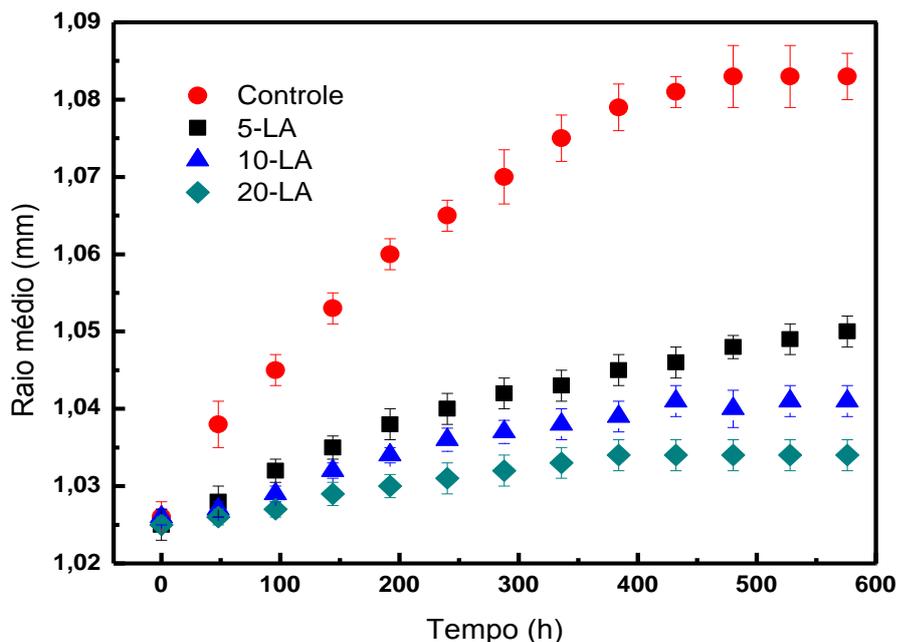


FIGURA 33 – Gráficos do raio médio em função do tempo de acompanhamento das colônias de antracnose: controle, 5-LA, 10-LA e 20-LA.

Na **FIGURA 33** é possível observar que as colônias escolhidas têm aproximadamente o mesmo raio médio no início da observação e que este raio cresce mais rapidamente no grupo controle, ao passo que com o aumento do número de camadas de FS há uma diminuição da expansão radial das colônias.

TABELA 1 – Velocidade de crescimento e porcentagem de inibição de colônias de alga e antracnose em função da quantidade de camadas de FS aplicado.

Grupos	Mancha de Alga		Antracnose	
	<i>Vcres</i> ($\mu\text{m/h}$)	%	<i>Vcres</i> ($\mu\text{m/h}$)	%
Controle	1,19 ± 0,08	-	0,14 ± 0,01	-
1-LA	0,35 ± 0,09	70	-	-
5-LA	0,11 ± 0,04	90	0,06 ± 0,01	57
10-LA	-	-	0,039 ± 0,004	71
20-LA	-	-	0,024 ± 0,004	86

(*Vcres*: velocidade de crescimento radial ou taxa de expansão radial; %: porcentagem de inibição radial das colônias).

Os valores da V_{cres} , que variam com o número de camadas de FS depositado, estão listados na TABELA 1. As velocidades de crescimento dos microrganismos analisados neste trabalho são mais lentas que as descritas em literatura, mas estes valores não puderam ser comparados, visto que a grande maioria dos experimentos relatados ocorre “*in vitro*”. A comparação se torna mais complexa, pois microrganismos incubados em diferentes meios de cultura também exibem diferenças significativas nas características de crescimento (ELMSLY; DIXON, 2008). Os grupos com 10 e 20 camadas de LA depositados em colônias de alga não foram apresentados devido à queda das folhas que estavam sendo analisadas e os dados coletados não foram suficientes para uma análise confiável.

As colônias de alga com 5 camadas de FS crescem ~ 10 vezes mais lenta que o grupo controle e 3 vezes mais lenta que o grupo com apenas 1 camada de FS. Ou ainda, há uma redução de ~ 90% na velocidade de crescimento das colônias com 5 camadas de FS. Valor similar (~86%) só foi alcançado com 20 camadas de LA sobre colônias de antracnose. Para as colônias de antracnose com 5 camadas o crescimento foi ~ 2,5 vezes mais lento que no grupo controle e para 20 camadas o crescimento foi reduzido em ~ 7 vezes. Ou seja, conforme aumenta o número de camadas do FS, ocorre uma redução na velocidade de crescimento das colônias.

A taxa de expansão foi reduzida na presença de FS e exposição à luz solar, provavelmente devido ao processo de inativação fotodinâmica das colônias (BARBÉRIO, 2013). Sequências de contornos como os apresentados nas FIGURAS 28 e 30 foram utilizadas para a determinação da dimensão fractal, DF, através do método de contagem de caixas. O expoente de rugosidade, α , foi determinado através da relação $DF = D - \alpha$ e os valores estão listados na TABELA 2. Observa-se que os valores da DF, em colônias de alga foram alterados provavelmente devido à combinação do FS+luz solar. Para antracnose não houve alterações significativas nos valores de DF embora os dados da TABELA 1 indiquem redução na taxa de expansão das colônias.

TABELA 2 – Dados morfométricos da análise de crescimento de colônias de alga e antracnose em função da quantidade de camadas de FS aplicado.

Grupos	Mancha de Alga		Antracnose	
	DF	α	DF	α
Controle	1,34 ± 0,03	0,66	1,05 ± 0,01	0,95
1-LA	1,33 ± 0,03	0,67	-	-
5-LA	1,24 ± 0,02	0,76	1,03 ± 0,01	0,97
10-LA	-	-	1,03 ± 0,01	0,97
20-LA	-	-	1,03 ± 0,01	0,97

(DF: Dimensão fractal; α : expoente de rugosidade)

Os dados da **TABELA 2** podem ser avaliados através de modelos de crescimento, que são ferramentas teóricas que correspondem a uma forma de analisar os expoentes de escala que caracterizam as superfícies. Por exemplo, o resultado numérico para o expoente de rugosidade da equação

$\frac{\partial h}{\partial t} = -K\nabla^4 h + \lambda\nabla^2(\nabla h^2) + \eta(x,t)$ é dado pela seguinte equação:

$$\alpha = \frac{4-d}{3} \tag{4.1}$$

De modo que para $d = 2$ o valor é de $\alpha = 0,66$, como os encontrados para o grupo controle e 1-LA (**TABELA 2**) para colônias de alga. Para o grupo 5-LA o valor do expoente de rugosidade aumenta, ou seja, a DF diminui. Essa diminuição da fractalidade pode ser resultado da inibição do crescimento das colônias, provocado pelo fenômeno de fotoinativação, que altera os expoentes de escala.

O expoente α também pode ser obtido pela resolução da equação

$\frac{\partial h}{\partial t} = -K\nabla^4 h + \eta(x,t)$ usando transformada de Fourier:

$$\alpha = \frac{4-d}{2} \tag{4.2}$$

e será igual a 1 para $d = 2$. Valores com expoente de rugosidade, $\alpha \sim 1$ como os encontrados para as colônias de antracnose, indicam que a

dinâmica de crescimento pode ser descrita pela segunda equação, que propõe o crescimento e a relaxação da interface.

O modelo de crescimento proposto por Eden ([BARABÁSI; STANLEY, 1995](#)) para explicar o processo de proliferação de células corresponde a proposta mais simples para crescimento celular, baseada na deposição aleatória de partículas e no fenômeno de agregação. Os resultados apresentados para mancha de alga e antracnose estão em desacordo com o proposto por Eden e indicam que o processo de crescimento das colônias de antracnose pode ser caracterizado pela difusão das células na superfície ($-K\nabla^4 h$) e que para colônias de alga, o número de células é conservado ($\lambda\nabla^2(\nabla h^2)$), isto é, a desorção celular deve ser insignificante.

Neste trabalho foi observado que a análise das bordas de colônias podem dar indicações a respeito da relação entre a habilidade de proliferação e a distribuição espacial de microrganismos. Nossos resultados são descritos pela classe universal MBE que é caracterizada pela taxa de crescimento linear, difusão celular nas bordas das colônias e proliferação restrita as bordas, ou seja, inibição do crescimento no interior das colônias. Esta análise está de acordo com a observação de 15 linhas celulares tumorais que exibiram a mesma dinâmica de crescimento descrita por MBE ([BRÚ et al., 2003](#)).

Os resultados indicam que é possível alterar essa dinâmica de crescimento em colônias de alga através do fenômeno de fotoinativação. Foi mostrado que a expansão radial das colônias é significativamente reduzida pela atuação do FS na presença de luz solar, indicando que é possível alterar a forma e o crescimento das colônias de microrganismos fitopatogênicos em campo, através da inativação fotodinâmica.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi analisado o crescimento de colônias de alga em folhas de goiabeira e de antracnose em folhas de cajueiro, frente a inativação fotodinâmica combinando o fotossensibilizador laranja de acridina, LA, e luz solar. Foi demonstrado que o LA é candidato a FS para aplicação em campo e que a técnica de deposição, usando spray, proposta neste trabalho é apropriada para esta finalidade por sua facilidade na deposição do FS e por não causar danos nas estruturas das folhas.

A taxa de evolução das colônias foi reduzida com o aumento da quantidade de camadas de FS aplicado. Este resultado é significativo, pois estudos indicam, por exemplo, que a eficácia de agentes antimicrobianos está associada ao crescimento das colônias.

A teoria fractal é adequada na análise da variação morfológica que ocorre durante o crescimento das colônias. Por tratamento de imagens foi possível estimar parâmetros referente à fractalidade do sistema. Estes parâmetros podem ser explicados por modelos de crescimento de interfaces fractais. Os valores dos expoentes de rugosidade para colônias de antracnose podem ser descritos pela difusão das células na superfície das folhas e para colônias de mancha de alga, são associados a crescimento da colônia, com relaxação da interface e dominado pelo processo de difusão celular.

A presença do FS em colônias de antracnose altera a dinâmica de crescimento ao passo que para mancha de alga além da velocidade de crescimento os valores dos expoentes críticos também são afetados. Isto sugere que a fotoirradiação interfere na dinâmica e na taxa de crescimento

das colônias, devendo ser, portanto, um fator a ser considerado no padrão de desenvolvimento dos microrganismos fitopatogênicos.

Em síntese, foi verificado que é possível alterar a dinâmica de crescimento através do fenômeno de fotoinativação e que o efeito pode ser descrito por meio de modelos de crescimento de interfaces fractais. O uso do *spray-LbL* pode ser uma solução para aplicação eficaz e segura no campo, de FSs com baixa ou nenhuma toxicidade. Estes resultados podem ajudar a identificar novas estratégias para controle de microrganismos fitopatogênicos que afetam diretamente a produção agrícola.

Os resultados deste trabalho poderão ser utilizados como ponto de partida para futuras investigações de inativação fotodinâmica em outros microrganismos fitopatogênicos e ainda com outros FSs de baixa toxicidade. Um outro ponto interessante a ser investigado é a dinâmica de crescimento destes microrganismos "*in vitro*" o que deverá facilitar a investigação dos danos causados pelo processo de inativação na estrutura dos microrganismos.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, N. B.; SHEMESH, A. **Localization of Aminoacridine Fluorescence in Lung Tumors of Rats**. JAMA, v. 187, n. 11, p. 481–493, 1964.
- ACKROYD, R. et al. **The History of Photodetection and Photodynamic Therapy**. Photochemistry and Photobiology, v. 74, n. 5, p. 656–669, 2001.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Oxford: Elsevier Academic Press, 2005.
- AGROLINK. **Mancha de alga (Cephaleuros mycoidea)**. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/mancha-de-alga_1618.html>. Acesso em: 29 de agosto de 2016.
- AGRONOVAS. **Fungo Destruidor**. Disponível em: <<http://www.agronovas.com.br/fungo-destruidor/>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2017.
- ALMEIDA, R. T.; VASCONCELOS, I.; FREIRE, V. F. **Hospedeiras da alga cephaleuros virescens kunze no estado do ceará, brasil**. Ciências Agrônômica, v. 16, n. 2, p. 53–55, 1985.
- ALMEIDA, A. et al. **Phage Therapy and Photodynamic Therapy: Low Environmental Impact Approaches to Inactivate Microorganisms in Fish Farming Plants**. Marine Drugs, v. 7, n. 3, p. 268–313, 2009.
- AMADO, A. M. **Agregação da Acridina Laranja em Soluções Aquosas e na Interação com Micelas de SDS**. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2013.
- AMARAL, A. L. et al. **Morphological Characterisation of Microbial Aggregates by Image Analysis**. RecPad'97 – 9th Portuguese Conference on Pattern Recognition, p. 95–100, 1997.
- AOKI, P. H. B. et al. **Spray layer-by-layer films based on phospholipid vesicles aiming sensing application via e-tongue system**. Materials Science and Engineering: C, v. 32, n. 4, p. 862–871, 2012.

- AOKI, P. H. B. **Sistemas Bioinspirados Aplicados no Estudo de Interação e Sensoriamento de Derivados Xantênicos**. 2014. 145 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Presidente Prudente/SP, 2014.
- ARMESTO, C. **Variabilidade Biológica e molecular de colletotrichum gloeosporioides em cafeeiros**. 2013. 99 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, 2013.
- ASSIS, T. A. et al. **Geometria fractal: propriedades e características de fractais ideais**. Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 30, n. 2, p. 2304.1–2304.10, 2008.
- AVNIR, D.; FARIN, D.; PFEIFER, P. **Surface Geometric Irregularity of Particulate Materials: The Fractal Approach**. Journal of Colloid and Interface Science, v. 103, n. 1, p. 12–14, 1985.
- BACKES, A. R.; BRUNO, O. M. **Técnicas de Estimativa da Dimensão Fractal: Um Estudo Comparativo**. Journal of Computer Science (Infocomp), v. 4, n. 3, p. 50–58, 2005.
- BAGNATO, V. S. **Novas Técnicas Ópticas para as Áreas da Saúde**. 1. ed. São Paulo: Livraria de Física, 2008.
- BARABÁSI, A.-L.; STANLEY, H. E. **Fractal concepts in surface growth**. 1. ed. New York: Cambridge University Press, 1995.
- BARBÉRIO, G. S. et al. **Photodynamic inactivation of Candida albicans mediated by a low density of light energy**. Lasers in Medical Science, v. 29, n. 3, p. 907–910, 2013.
- BARBOSA, F. R.; LIMA, M. F. **A cultura da goiaba**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010.
- BARRON, A. R. **Molecular Beam Epitaxy**. Disponível em: <<http://cnx.org/content/m25712/latest/>>. Acesso em: 9 de outubro de 2016.
- BARROS, L. M. et al. **Recomendações Técnicas para a Cultura do**

- Cajueiro-anão-precoce.** Fortaleza/CE: EMBRAPA/CNPAT (Circular Técnica 1), 1993.
- Bl, S. et al. **Study of interactions of flavonoids with DNA using acridine orange as a fluorescence probe.** *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 119, n. 1, p. 199–208, 2006.
- BRAGANÇA, C. A. D. et al. **Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil.** *Fungal Biology*, v. 120, n. 4, p. 547–561, 2016.
- BRAZ, É. C. **Análise de Superfícies Seletivas em Frequência com Geometrias Multifractais.** 2014. 100 f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica e de Computação) – Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2014.
- BRITO, J. B. **Variação Morfológica e Influência de Fatores Experimentais em Filmes Automontados de Proteína e Corante.** 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças/MT, 2012.
- BROOKS, F. et al. **The Trentepohliales (Ulvophyceae, Chlorophyta): An Unusual Algal Order and its Novel Plant Pathogen - Cephaleuros.** *Plant Disease*, v. 99, n. 6, p. 740–753, 2015.
- BRÚ, A. et al. **The Universal Dynamics of Tumor Growth.** *Biophysical Journal*, v. 85, n. 5, p. 2948–2961, 2003.
- BRUENING, M.; DOTZAUER, D. **Polymer films: Just spray it.** *Nature Materials*, v. 8, n. 6, p. 449–450, 2009.
- CANNON, P. F. et al. ***Colletotrichum* - current status and future directions.** *Studies in mycology*, v. 73, n. 1, p. 181–213, 2012.
- CARDOSO, J. E. et al. **Doenças do cajueiro.** In: ARAÚJO, J. P. P. (1 ed.). *Agronegócio caju: práticas e inovações.* Brasília, DF: Embrapa, cap. 2, p. 217-238, 2013.

CARVALHO, P. R. S. **Extratos Vegetais: Potencial Elicitor de Fitoalexinas e atividade Antifúngica em Antracnose do Cajueiro**. 2010. 64 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal/SP, 2010.

CASSAL, V. B. et al. **Agrotóxicos: Uma Revisão de suas Consequências para a Saúde Pública**. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, v. 18, n. 1, p. 437–445, 2014.

CAVALCANTI, J. J. V et al. **Resistência genética de clones de cajueiro anão precoce às principais fitomoléstias**. Fortaleza/CE: Embrapa Agroindústria Tropical (Boletim de Pesquisa 34), 2000.

CHEMSPIDER. **Acridine Orange CSID:56136**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.56136.html>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

CHIME, J. A. et al. **A utilização de agrotóxicos e o aumento de índices de câncer na sociedade**. In: Libro de Resúmenes del 1º Congreso Latinoamericano sobre Conflictos Ambientales Oportunidades. Universidad Nacional de General Sarmiento, Buenos Aires: ColCA, 2014.

CHOI, K.-H. et al. **Singlet oxygen generating nanolayer coatings on NiTi alloy for photodynamic application**. Surface & Coatings Technology, v. 250, n. 1, p. s62–s67, 2010.

CHOUHDURY, M. M.; COSTA, T. S.; DOS ANJOS, J. B. **Controle da antracnose pós-colheita da manga causada por Colletotrichum gloeosporioides**. Petrolina/PE: Embrapa (Comunicado Técnica 116), 2003.

COELHO, R. C.; COSTA, L. F. **The box-counting fractal dimension: Does it provide an accurate subsidy for experimental shape characterization? If so, how to use it**. Anais do VIII SIBGRAPI, v. 95, p. 183–190, 1995.

COSTA, R. V et al. **A antracnose do sorgo**. Fitopatologia Brasileira, v. 28, n. 4, p. 345–354, 2003.

CRUZ, T. G. S. **Leis de Escala e Dimensão Fractal em Filmes Finos: Microscopia de Força Atômica e Voltametria Cíclica**. Revista Physicae, v.

1, p. 29–36, 2000.

DA COSTA, P. C. **Metodologia aplicada ao cálculo da dimensão fractal de formações urbanas utilizando o índice de desenvolvimento humano municipal (IDHM) como critério de seleção.** Revista Mackenzie de Engenharia e Computação, v. 14, n. 1, p. 71–90, 2014.

DA COSTA, R. C. et al. **Colletotrichum gloeosporioides causando manchas foliares em plantas de canela-da-índia no Estado do Pará.** Summa Phytopathologica, v. 39, n. 3, p. 218–218, 2013.

DA SILVA, F. R.; OLIVEIRA, H. S. M.; MARINHO, G. S. **Variação do índice de radiação solar ultravioleta em Natal-RN entre 2001 e 2007.** II Congresso Brasileiro de Energia Solar e III Conferência Regional Latino-Americana da ISES, p. 1–7, 2008.

DA SILVA, R. C. **Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica.** 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 2007.

DAMM, U. et al. **Colletotrichum: species, ecology and interactions.** IMA Fungus, v. 1, n. 2, p. 161–165, 2005.

DE ARAÚJO, D. C. et al. **Análise técnica e econômica do cultivo do cajueiro-anão (Anacardium occidentale L.) na regional de Jales-SP.** Revista Brasileira de Fruticultura, v. 32, n. 2, p. 444–450, 2010.

DE MENEZES, H. D. **Inativação fotodinâmica de conídios dos fungos Aspergillus nidulans, Colletotrichum acutatum e Colletotrichum gloeosporioides com fotossensibilizadores fenotiazínicos e cumarínicos.** 2012. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2012.

DE MENEZES, H. D. et al. **Furocoumarins and coumarins photoinactivate Colletotrichum acutatum and Aspergillus nidulans fungi under solar radiation.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 131, p. 74–83, 2014a.

- DE MENEZES, H. D. et al. **In vitro photodynamic inactivation of plant-pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with Novel Phenothiazinium photosensitizers**. Applied and environmental microbiology, v. 80, n. 5, p. 1623–1632, 2014b.
- DE SOUZA, N. C. **Adsorção de poli(o-metoxianilina) em filmes automontados**. 2002. 141 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 2002.
- DEAN, R. et al. **The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology**. Molecular Plant Pathology, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.
- DECHER, G. **Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites**. Science, v. 277, n. 5330, p. 1232–1237, 1997.
- DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. **Photodynamic therapy for cancer**. Nature Reviews Cancer, v. 3, n. 5, p. 380–387, 2003.
- DONNELLY, D. P.; WILKINS, M. F.; BODDY, L. **An integrated image-analysis approach for determining biomass radial extent and box-count fractal dimension of microscopic mycelial systems**. Binary Computing in Microbiology, v. 7, n. 1, p. 19–28, 1995.
- DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. **Antifungal photodynamic therapy**. Microbiological Research, v. 163, n. 1, p. 1–12, 2008.
- DOS SANTOS, F. M.; DA SILVA, F. R.; MARINHO, G. S. **Estudo Probabilístico do Índice de Radiação Ultravioleta em Natal/RN–Brasil**. MensAgitat, v. 6, n. 1-2, p. 47–52, 2011.
- DOS SANTOS, K. F. et al. **Spray layer-by-layer films for photodynamic inactivation**. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 15, p. 197–201, 2016.
- DOUGHERTY, T. J. **Photodynamic Therapy**. Photochemistry and Photobiology, v. 58, n. 6, p. 895–900, 1993.
- DUARTE, V. **Guava (*Psidium guajava* L.): antracnose**. Disponível em:

<<http://objetoseducacionais2.mec.gov.br/handle/mec/7508>>. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.

ELMSLY, T. A.; DIXON, J. **Growth Rates of Ripe Rot Fungi at Different Temperatures**. New Zealand Avocado Growers' Association Annual Research Report, v. 8, p. 77–84, 2008.

ESQUEF, I. A.; DE ALBUQUERQUE, M. P.; DE ALBUQUERQUE, M. P. **Processamento Digital de Imagens**. Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, p. 1–12, 2003.

FALCONER, K. J. **Fractal geometry: mathematical foundations and applications**. 1. ed. John Wiley & Sons, 1990.

FERREIRA, M. R. **Autômato Celular com Probabilidades de Transição Dependentes da Altura para o Estudo do Crescimento de Superfícies**. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em Modelagem Matemática e Computacional) – Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2009.

FILHO, R. M. L.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. **Caracterização Enzimática e Patogenicidade Cruzada de Colletotrichum spp. Associados a Doenças de Pós-Colheita***. Fitopatologia Brasileira, v. 28, n. 6, p. 620–625, 2003.

FISCHER, I. H. et al. **Efeito de fungicidas e produtos alternativos no controle da antracnose e da pinta preta da goiaba**. Semina: Ciências Agrárias, v. 33, n. 1, p. 2753–2766, 2012.

FRACAROLLI, L. **Isolamento , caracterização e avaliação da atividade fotossensibilizadora de cumarinas e furanocumarinas extraídas de espécies de Citrus**. 2015. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2015.

FRANCA, G. S. et al. **Post-harvest control anthracnose in pepper by yeast Rhodotorula glutinis**. Bioscience Journal, v. 31, n. 2, p. 451–459, 2015.

- FUJIKAWA, H.; MATSUSHITA, M. **Fractal growth of Bacillus subtilis on agar plates**. Journal of the Physical Society of Japan, v. 58, n. 11, p. 3875–3878, 1989.
- FUJIKAWA, H.; MATSUSHITA, M. **Bacterial fractal growth in the concentration field of nutrient**. Journal of the Physical Society of Japan, v. 60, n. 1, p. 88–94, 1991.
- FUKAO, N. et al. **Automatic Spray-LBL Machine Based on in-Situ QCM Monitoring**. Macromolecules, v. 44, n. 8, p. 2964–2969, 2011.
- FUZZO, R. A. **Fractais: algumas características e propriedades**. In: Encontro de Produção Científica e Tecnológica. Faculdade Estadual de Ciências e Letras de Campo Mourão, Campo Mourão/PR: IV EPCT, 2009.
- GAD, F. et al. **Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria**. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 48, n. 6, p. 2173–2178, 2004.
- GALICIA-GARCÍA, C. **Algas...parasitas?** Cymbella - Revista de investigación y difusión sobre algas, v. 1, n. 3, p. 21–28, 2015.
- GALLI, J. A. et al. **Avaliação da Incidência de Antracnose, do Desempenho e Estado Nutricional de Variedades de Mangueira, para Cultivo Orgânico, na Região Centro-Norte do Estado de São Paulo**. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 31, n. 3, p. 701–709, 2009.
- GALLI, J. A. et al. **Quantificação de doenças pós-colheita em acessos de goiabeira cultivados em sistema orgânico**. Pesquisa Agropecuária Tropical, v. 45, n. 2, p. 225–230, 2015.
- GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R. **Podridão da Uva Madura ou Podridão de Glomerella - Biologia, Epidemiologia e Controle**. Bento Gonçalves/RS: Embrapa Uva e Vinho (Circular Técnica 52), 2004.
- GHINI, R.; MIMATI, H. **Resistência de Fungos a Fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002.
- GOMES, M. N. **Vinho em Filmes Nanoestruturados: Processos de Adsorção e Análise Morfológica**. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em

Ciência de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças/MT, 2013.

GORZA, F. D. S. **Imobilização em Filmes LbL de Clorofila Encapsulada em Lipossomos - Liberação de Fármacos e Inativação Fotodinâmica.** 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças/MT, 2014.

GULICK, D. **Encounters with Chaos.** McGraw: Hill International Editions – Mathematics and Statistics Series, 1992 apud BACKES, A. R.; BRUNO, O. M. Técnicas de Estimativa da Dimensão Fractal: Um Estudo Comparativo. *Journal of Computer Science (Infocomp)*, v. 4, n. 3, p. 50–58, 2005.

GUTFRAIND, R.; SHEINTUCH, M.; AVNIR, D. **Fractal and multifractal analysis of the sensitivity of catalytic reactions to catalyst structure.** *The Journal of Chemical Physics*, v. 95, n. 8, p. 6100, 1991.

HAMBLIN, M. R. et al. **Rapid Control of Wound Infections by Targeted Photodynamic Therapy Monitored by In Vivo Bioluminescence Imaging.** *Photochemistry and Photobiology*, v. 75, n. 1, p. 51–57, 2002.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. **Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?** *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, v. 3, n. 5, p. 436–450, 2004.

HAN, K.-S. et al. **First report of algal leaf spot associated with *Cephaleuros virescens* on greenhouse-grown *Ficus benghalensis* in Korea.** *Australasian Plant Disease Notes*, v. 6, n. 1, p. 72–73, 2011.

HASS, B. S.; WEBB, R. B. **Photodynamic effects of dyes on bacteria: IV. Lethal effects of acridine orange and 460- or 500-nm monochromatic light in strain of *Escherichia coli* that differ in repair capability.** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 81, n. 3, p. 277–285, 1981.

HERMERSDÖRFER, H. et al. **Influence of culture conditions on mycelial structure and polygalacturonase synthesis of *Aspergillus niger*.** *Journal*

of Basic Microbiology, v. 27, n. 6, p. 309–315, 1987.

HORI, H. et al. **Marginal resection and acridine orange photodynamic therapy in a cat with recurrent cutaneous malignant melanoma.** International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine, v. 12, n. 3, p. 181–185, 2014.

HUBBARD, M. J.; MARKIE, D.; POULTER, R. T. **Isolation and morphological characterization of a mycelial mutant of Candida albicans.** Journal of bacteriology, v. 165, n. 1, p. 61–65, 1986.

HYDE, K. D. et al. **Colletotrichum – names in current use.** Fungal Diversity, v. 39, n. 1, p. 147–182, 2009.

INPE, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Radiação Ultravioleta: O que é Radiação Ultravioleta?** Disponível em: <<http://satelite.cptec.inpe.br/uv/>>. Acesso em: 16 de setembro de 2016a.

INPE, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Radiação Ultravioleta: O que é Índice Ultravioleta (IUV)?** Disponível em: <<http://satelite.cptec.inpe.br/uv/>>. Acesso em: 16 de setembro de 2016b.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. **Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 85, n. 4, p. 501–511, 2010.

IZQUIERDO, A. et al. **Dipping versus Spraying : Exploring the Deposition Conditions for Speeding Up Layer-by-Layer Assembly.** Langmuir, v. 21, n. 16, p. 7558–7567, 2005.

JACKSON, S. D. **Fractal analysis of co hydrogenation over rhodium catalysts.** Reaction Kinetics and Catalysis Letters, v. 39, n. 2, p. 223–226, 1989.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. DE A.; QUEIROZ, S. C. DO N. **Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs.** Química Nova, v. 32, n. 4, p. 996–1012, 2009.

JORI, G. et al. **Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications.** Lasers in

Surgery and Medicine, v. 38, n. 5, p. 468–481, 2006.

JUCHEM, P. P. et al. **Riscos à Saúde da Radiação Ultravioleta**. Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica - SBCP, v. 12, n. 2, p. 1–25, 1998.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. **Doenças da goiabeira no Cerrado**. Planaltina/DF: Embrapa Cerrado (Circular Técnica 15), 2011.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. **Photodynamic therapy in dermatology**. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 42, n. 3, p. 389–413, 2000.

KESSEL, D. **Photodynamic therapy: from the beginning**. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 1, n. 1, p. 3–7, 2004.

KIM, K. D.; OH, B. J.; YANG, J. **Differential Interactions of a Colletotrichum gloeosporioides isolate with green and red pepper fruits**. Phytoparasitica, v. 27, n. 2, p. 97–106, 1999.

KIM, Y. et al. **Morphology controlled bulk-heterojunction layers of fully electro-spray coated organic solar cells**. Solar Energy Materials and Solar Cells, v. 105, p. 272–279, 2012.

KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia - Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1997.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. **State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy**. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 66, n. 2, p. 89–106, 2002.

KROGMAN, K. C. et al. **Automated Process for Improved Uniformity and Versatility of Layer-by-Layer Deposition**. Langmuir, v. 23, n. 6, p. 3137–3141, 2007.

KUMAR, B. et al. **Conductive bio-Polymer nano-Composites (CPC): Chitosan-carbon nanotube transducers assembled via spray layer-by-layer for volatile organic compound sensing**. Talanta, v. 81, n. 3, p. 908–915, 2010.

KUSUZAKI, K. et al. **Photodynamic Inactivation with Acridine Orange on a Multidrug-resistant Mouse Osteosarcoma Cell Line**. Japanese Journal of Cancer Research, v. 91, n. 4, p. 439–445, 2000.

KUSUZAKI, K. et al. **Acridine Orange could be an Innovative Anticancer Agent under Photon Energy**. In vivo (Athens, Greece), v. 21, n. 2, p. 205–214, 2007a.

KUSUZAKI, K. et al. **Clinical Outcome of a Novel Photodynamic Therapy Technique Using Acridine Orange for Synovial Sarcomas**. Photochemistry and Photobiology, v. 81, n. 3, p. 705–710, 2007b.

LEAL, S. S.; TIBA, C.; PIACENTINI, R. D. **Estudo da Irradiação Eritêmica em Recife (PE)**. Avances em Energías Renovables y Medio Ambiente, v. 14, p. 23–28, 2010.

LIM, T. K.; MANICOM, B. Q. **Diseases of guava**. In: Ploetz, R. C. Diseases of tropical fruit crops. Homestead: CABI Publishing, cap. 12, p. 275-289, 2003.

LIMA, M. L. P. **Estudos em Doenças de Plantas: Diagnoses do mês de ABRIL de 2015**. Disponível em: <<http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2015/04/diagnoses-do-mes-de-abril-de-2015.html>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2017.

LIU, Q. et al. **Free-Standing Highly Conductive Transparent Ultrathin Single-Walled Carbon Nanotube Films**. Journal of the American Chemical Society, v. 132, n. 46, p. 16581–16586, 2010.

LOPES, M. G. C. **Algas: Características gerais, classificação e reprodução**. Disponível em: <<https://educacao.uol.com.br/disciplinas/biologia/algas-2-caracteristicas-gerais-classificacao-e-reproducao.htm>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2017.

LÓPEZ-BAUTISTA, J. M.; WATERS, D. A.; CHAPMAN, R. L. **Constancea 83.1: The Trentepohliales Revisited**. Disponível em: <http://ucjeps.berkeley.edu/constancea/83/lopez_etal/trentepohliales.html>. Acesso em: 28 de agosto de 2016.

- MACHADO, A. E. H. **Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas**. Química Nova, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.
- MACHADO, R. F. C.; FACHI, L. R.; SILVA, L. M. **Incidência da antracnose em cultivos de cajueiro em Mato Grosso**. Revista MT Horticultura, v. 2, n. 1, p. 23–26, 2016.
- MAISCH, T. **Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future?** Lasers in Medical Science, v. 22, n. 2, p. 83–91, 2007.
- MALAGI, G. et al. **Detecção de mancha-de-alga (Cephaleuros virescens Kunze) em citros no estado do Paraná**. Revista Brasileira de Agrociências, v. 17, n. 1-4, p. 148–152, 2011.
- MANDELBROT, B. B. **How Long Is the Coast of Britain? Statistical Self-Similarity and Fractional Dimension**. Science, v. 156, n. 3775, p. 636–638, 1967.
- MANDELBROT, B. B. **Self-Affine Fractals and Fractal Dimension**. Physica Scripta, v. 32, p. 257–260, 1985.
- MARLATT, R. B.; CAMPBELL, C. W. **Incidence of algal disease (Cephaleuros sp.) in selections of guava (Psidium guajava)**. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, v. 93, p. 109–110, 1980.
- MARTIS, I. et al. **Produção de Colletotrichum Gloeosporioides em meios líquidos**. Brasília/DF: Embrapa (Circular Técnica 45), 2005.
- MATIELLO, J.; BONALDO, S. M. **Atividade elicitora de fitoalexinas em Soja e Sorgo por extratos e tinturas de espécies medicinais**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 15, n. 4, p. 541–550, 2013.
- MATSUYAMA, T.; MATSUSHITA, M. **Fractal morphogenesis by a Bacterial Cell Population**. Critical Reviews in Microbiology, v. 19, n. 2, p. 117–135, 1993.
- MEAKIN, P. **A new model for biological pattern formation**. Journal of Theoretical Biology, v. 118, n. 1, p. 101–113, 1986.
- MEDEIROS, I. F.; BARRETO, A. F.; FREIRE, E. C. B. S. **Etiologia e**

Progresso da Antracnose do Cajueiro (*Anacardium Occidentale L.*) em Pombal e Paulista, Paraíba. Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável, v. 6, n. 1, p. 107–115, 2011.

MELO, W. C. M. A.; PERUSSI, J. R. **Comparando Inativação Fotodinâmica e Antimicrobianos.** Revista de Ciências Farmacêuticas Basi, v. 33, n. 3, p. 331–340, 2012.

MENEZES, M. **Aspectos biológicos e taxonômicos de o gênero colletotrichum.** Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v. 3, p. 170–179, 2006.

MERIDA, M.; PALMATEER, A. J. **2013 Florida Plant Disease Management Guide: Guava (*Psidium guajava*).** IFAS Extension University of Florida, v. PP-232, p. 1–7, 2014.

MICHEL, M. et al. **Layer by Layer Self-Assembled Polyelectrolyte Multilayers with Embedded Phospholipid Vesicles Obtained by Spraying: Integrity of the Vesicles.** Langmuir, v. 21, n. 17, p. 7854–7859, 2005.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia.** Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2001.

MROZ, P. et al. **Stable synthetic bacteriochlorins overcome the resistance of melanoma to photodynamic therapy.** The FASEB journal, v. 24, n. 9, p. 3160–3170, 2010.

MYCOBANK. **Colletotrichum.** Disponível em: <<http://www.mycobank.org/BioMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=33692&Fields=All>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2017.

NASCIMENTO, I. M. **Estudo químico de duas linhagens de fungos endofíticos com atividade ao fitopatógeno Colletotrichum sp.** 2015. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2015.

NELSON, S. C. **Cephaleuros Species, the Plant-Parasitic Green Algae.** Plant Disease, v. 43, p. 1–6, 2008.

NOZAKI, M.; DETONI, A. M.; DONADEL, F. **Controle alternativo de colletotrichum gloeosporioides em frutos de goiaba com óleos essenciais.** Anhanguera Educacional Ltda - Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, v. 17, n. 2, p. 63–69, 2013.

NUNES, R. S. R. **Geometria Fractal e Aplicações.** 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ensino da Matemática) – Departamento de Matemática Pura, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto/Portugal, 2006.

OBERT, M.; PFEIFER, P.; SERNETZ, M. **Microbial growth patterns described by fractal geometry.** Journal of bacteriology, v. 172, n. 3, p. 1180–1185, 1990.

PALMGREN, M. G. **Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: Mechanism and limitations.** Analytical Biochemistry, v. 192, n. 2, p. 316–321, 1991.

PAPAGIANNI, M. **Quantification of the fractal nature of mycelial aggregation in Aspergillus niger submerged cultures.** Microbial Cell Factories, v. 5, n. 1, p. 5, 2006.

PEDRO, G. C. **Agregados Fractais em Filmes de Clorofila.** 2014. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças/MT, 2014.

PEREIRA, Á. J. et al. **Uso das folhas de Angico e Nim no controle da antracnose em cajueiro anão precoce Anacardium occidentale L.** Reuniões Anuais - Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - Fortaleza/CE, v. 57, 2005.

PFEIFER, P.; AVNIR, D. **Chemistry in noninteger dimensions between two and three. I. Fractal theory of heterogeneous surfaces.** The Journal of Chemical Physics, v. 79, n. 7, p. 3558, 1983.

PHAM, V. H. et al. **Fast and simple fabrication of a large transparent chemically-converted graphene film by spray-coating.** Carbon, v. 48, n. 7, p. 1945–1951, 2010.

- PINHEIRO, S. S. C. **Qualidade de goiabas ensacadas e manejadas com diferentes produtos fitossanitários, sob manejo orgânico**. 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Scientiae) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2006.
- PINTO, S. C. D. **Estimação da Dimensão Fractal de Imagens de SPM**. 2001. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 2001.
- POLTRONIERI, T. P. DE S. et al. **Alga causando necrose foliar em helicônia no Pará**. Summa Phytopathol, v. 39, n. 2, p. 139, 2013.
- POPA, G. et al. **Nanoscale Precipitation Coating: The Deposition of Inorganic Films through Step-by-Step Spray-Assembly**. ACS Nano, v. 4, n. 8, p. 4792–4798, 2010.
- PRAKASH, N. et al. **Reliability of acridine orange fluorescence microscopy in oral cytodiagnosis**. Indian Journal of Dental Research, v. 22, n. 5, p. 649–653, 2011.
- RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. **A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente**. Revista Liberato, v. 10, n. 14, p. 149–158, 2009.
- RIBEIRO, J. N.; FLORES, A. V. **Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta conta o câncer**. Physicae, v. 5, n. 5, p. 5–14, 2005.
- RICKMAN, L. et al. **Rapid Diagnosis of Malaria by Acridine Orange Staining of Centrifuged Parasites**. The Lancet, v. 333, n. 8629, p. 68–71, 1989.
- RODRIGUES, G. B. **Inativação fotodinâmica de espécies de Candida e Trichophyton e de Cryptococcus neoformans com fotossensibilizadores fenotiazínicos e com uma cloroalumínio ftalocianina em nanoemulsão**. 2012. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2012.
- ROMIO, K. B. **Incorporação de Tricosan e Laranja de Acridina em**

Lipossomas para Avaliação da Susceptibilidade de Candida albicans. 2015. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças/MT, 2015.

ROSSETTO, C. J. **Doenças da Mangueira - Antracnose.** Disponível em: <<http://www.infobibos.com/Artigos/AntracnoseManga/Antracnose.htm>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2017.

ROZWALKA, L. C. **Controle Alternativo Da Antracnose.** 2003. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2003.

SATONAKA, H. et al. **Acridine Orange Inhibits Pulmonary Metastasis of Mouse Osteosarcoma.** Anticancer research, v. 31, n. 12, p. 4163–4168, 2011.

SCHLENOFF, J. B.; DUBAS, S. T.; FARHAT, T. **Sprayed Polyelectrolyte Multilayers.** Langmuir, v. 16, n. 26, p. 9968–9969, 2000.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.** Nature Methods, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SEBRAE. **Cajueiro: vivendo e aprendendo.** Natal/RN: EMPARN, 2013.

SERI-LEVY, A.; AVNIR, D. **Fractal analysis of surface geometry effects on catalytic reactions.** Surface Science, v. 248, n. 1-2, p. 258–270, 1991.

SERRA, I. M. R. S.; COELHO, R. S. B.; MENEZES, M. **Caracterização fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multispóricos de Colletotrichum gloeosporioides.** Summa Phytopathologica, v. 34, n. 2, p. 113–120, 2008.

SIGMA-ALDRICH. **Acridina Orange base CAS:494-38-2 (Product Specification).** Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/235474?lang=en®ion=US>>. Acesso em: 16 de dezembro de 2016.

SILVA, M. M.; SOUZA, W. A. **Dimensão Fractal.** Revista Eletrônica de

Matemática, v. 2, p. 1–15, 2010.

SILVA, A. A. **Medidas de radiação solar ultravioleta em Belo Horizonte e saúde pública**. Revista Brasileira de Geofísica, v. 26, n. 4, p. 417–425, 2008.

SILVA, É. R.; BORISSEVITCH, I. **Estudo da cinética de fototransformação do acridina laranja na interação com sistemas micro-organizados sob a ação da luz visível**. Revista Brasileira de Física Médica, v. 4, n. 2, p. 75–78, 2010.

SILVA, I. B.; FUJII, M. T.; SCAFF, M. F. **Diversidade de Algas Marinhas**: Instituto de Botânica - Jardim Botânico de São Paulo, Programa de Capacitação de Monitores e Educadores. São Paulo, 2010: Disponível em: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Diversidade_Algas_Marinhas_Ingrid_Balesteros.pdf>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2017.

SILVA, J. R. et al. **Morphological alterations on Citrobacter freundii bacteria induced by erythrosine dye and laser light**. Lasers in medical science, v. 30, n. 1, p. 469–473, 2015.

SIQUEIRA, R. **Janelas para o Infinito: Exposição de Fractais**. Disponível em: <<http://www.insite.com.br/fractarte/artigos.php>>. Acesso em: 07 de junho de 2016.

SOARES, A. R.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. **Infecção de goiabas por Colletotrichum gloeosporioides e Colletotrichum acutatum sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento**. Tropical Plant Pathology, v. 33, n. 4, p. 265-272, 2008.

STANGARLIN, J. R. et al. **Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 2, p. 16–21, 1999.

STRUGGER, S. **Fluorescence Microscope Examination of Bacteria in Soil**. Canadian Journal of Research, v. 26c, n. 2, p. 188–193, 1948.

SUNPAPAO, A. et al. **Cephaleuros parasiticus, associated with algal spot disease on Psidium guajava in Thailand**. Australasian Plant Disease

Notes, v. 11, n. 1, p. 12, 2016.

SUTO, Y.; OHTANI, S. **Morphology and Taxonomy of Five Cephaleuros Species (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan, Including Three New Species**. Phycologia, v. 48, n. 4, p. 213–236, 2009.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TAM, C. M.; MATSUURA, T.; TREMBLAY, A. Y. **The fractal nature of membranes**. Journal of Colloid and Interface Science, v. 147, n. 1, p. 206–2012, 1991.

TAM, C. M.; TREMBLAY, A. Y. **Membranes as fractals: implication and consequences**. Desalination, v. 90, n. 1-3, p. 77–91, 1993.

TOMSON, S. H.; EMMETT, E. A.; FOX, S. H. **Photodestruction of Mouse Epithelial Tumors after Oral Acridine Orange and Argon Laser**. Cancer research, v. 34, n. 11, p. 3124–3127, 1974.

TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; NETO, C. F. **Photodynamic therapy in dermatology: basic principles and clinical use**. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 84, n. 5, p. 445–459, 2009.

TRESCHER, T. F. **Influência da Inativação Fotodinâmica sobre a Viabilidade e Dinâmica de Crescimento de Candida albicans**. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças/MT, 2014.

VECHT-LIFSHITZ, S. E.; ISON, A. P. **Biotechnological applications of image analysis: present and future prospects**. Journal of Biotechnology, v. 23, p. 1–18, 1992.

VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O. **Doenças em campo**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000fielsfi902wyiv80z4s473ewtp564.html>>. Acesso em: 23 de janeiro de 2017.

VON BERTALANFFY, L.; BICKIS, I. **Identification of Cytoplasmic**

Basophilia (Ribonucleic Acid) by Fluorescence Microscopy. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, v. 4, n. 5, p. 481–493, 1956.

WHITELAW-WECKERT, M. A. et al. **Phylogenetic relationships and pathogenicity of Colletotrichum acutatum isolates from grape in subtropical Australia.** Plant Pathology, v. 56, n. 3, p. 448–463, 2007.

WHO, World Health Organization. **Global Solar UV Index: A Practical Guide.** Les Diablerets: World Health Organization (WHO), 2002.

WHO, World Health Organization. **Protecting Workers From Ultraviolet Radiation.** Germany: World Health Organization (WHO), 2007.

ZAMPIERI, A.; GREENBERG, J. **Mutagenesis by acridine orange and proflavine in Escherichia coli strain S.** Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 2, n. 6, p. 552–556, 1965.

APÊNDICE A – DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

A.1 – Artigo submetido

K. B. Romio, K. F. dos Santos, R. da Silva, M. F. C. Pedro, A. S. Kalck, P. C. S. Souto, J. R. Silva, N. C. de Souza. *Incorporation of triclosan and acridine orange into liposomes for evaluating the susceptibility of *Candida albicans**

A.2 – Artigo em fase final de escrita

A. S. Kalck, M. F. C. Pedro, K. F. dos Santos, M. S. Sousa, L. M. Possamai, J. R. Silva, N. C. de Souza. *Mathematical models and fractal analysis for the investigation of the photodynamic inactivation in phytopathogenic microorganisms.*

M. F. C. Pedro, A. S. Kalck, K. F. dos Santos, M. S. Sousa, J. R. Silva, N. C. de Souza. *Controlled release in ultrathin films of erythrosine and triclosan.*

A.3 – Resumos publicado em anais de congressos nacionais e regionais

Fractal Aggregates in Chlorophyll Films – Pedro, G. C., Gorza, F. D. S., Kalck, A. S., Pedro, M. F. C., de Souza, N. C., Silva, J. R. **Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (CBECIMAT)**; Natal-RN, 2016.

Evaluation of Membrane used in Treatment of Burns – Sousa, M. A. O., da Rocha, H. D., Sousa, M. S., Pedro, M. F. C., Kalck, A. S., Silva, J. R., de Souza, N. C., dos Santos, K. F., Faria, M. A. C., Possamai, L. M. **Congresso**

Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (CBECIMAT); Natal-RN, 2016.

Fractal Analysis of Fungal Cells – **Kalck, A. S.**, de Souza, N. C., Silva, J. R. **VI Workshop PPGMAT;** Barra do Garças-MT, 2016.

Análise do Crescimento Fractal de Células Fúngicas – **Kalck, A. S.**, de Souza, N. C. **VII mostra de Pós-Graduação.** Cuiabá-MT, 2016.

A.4 – Participações em eventos nacionais e regionais

22º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (CBECIMAT - 2016). Natal – RN, (06 a 10/11/2016).

V Workshop PPGMAT (UFMT - 2015). Barra do Garças – MT (27 a 28/08/2015).

VI Workshop PPGMAT (UFMT - 2016). Barra do Garças – MT (24 a 26/08/2016).

VI Semana Acadêmica – VII mostra de Pós-Graduação (UFMT - 2016). Barra do Garças – MT (14 a 16/09/2016).