UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

DANIÉLLE SANTOS LIMA

Identificação e caracterização dos metabólitos secundários ativos secretados pela bactéria *Bacillus velezensis* que causam inibição no crescimento de fungos filamentosos fitopatogênicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnólogicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2018

DANIÉLLE SANTOS LIMA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ATIVOS SECRETADOS PELA BACTÉRIA *Bacillus velezensis* QUE CAUSAM INIBIÇÃO NO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS FITOPATOGÊNICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia
Orientador: Prof. Dr.: José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior
Coorientador(a): Prof(a) Dr(a).: Miriam Sannomiya

Versão original

São Paulo

2018

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Santos-Lima, Daniélle
Identificação e caracterização dos metabólitos secundários ativos secretados pela bactéria B*acillus velezensis* que causam inibição no crescimento de fungos filamentosos fitopatogênicos. Daniélle Santos Lima; José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior; Miriam Sannomiya. -- São Paulo, 2018.
79 p.

Dissertação (Mestrado) - - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Bacillus velezensis* 2. Fungos Fitopatogênicos 3. Surfactina 4. Antifúngico 5. Iturina. Ferreira Júnior, Prof. Dr. José Ribamar dos Santos, orientador II. Sannomiya, Miriam, co-orientadora.III Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): **Daniélle Santos Lima**

Título da Dissertação: **Identificação e caracterização dos metabólitos secundários ativos secretados pela bactéria *Bacillus velezensis* que causa inibição no crescimento de fungos filamentosos fitopatogênicos.**

Orientador(a): Prof. Dr.: **José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a / / , considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

EACH

Escola de Artes, Ciências e Humanidades
da Universidade de São Paulo

São Paulo, 20 de julho de 2016.

Prof. Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Junior – Orientador
Danielle Santos Lima – Orientanda
Projeto de Mestrado – "Isolamento, identificação, caracterização e determinação da estrutura do metabólito secundário majoritário ativo secretado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens*que causa inibição no crescimento de fungos filamentosos"

Instituição – Escola de Artes, Ciências e Humanidades – EACH/USP

De acordo com a Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, somente estão sujeitos à análise pelo CEUA os projetos de pesquisa ou atividade de ensino que envolvam animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata.

Dessa forma, declaro que o referido estudo não se enquadra nessas normas e, portanto, está isento de análise ou aprovação por esse CEUA.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Mario Pedrazzoli Neto
Comitê de Ética em Uso de Animais em ExperimentaçãoEACH/USP

Av. Arlindo Bettio, 1000 Ermelino Matarazzo SP CEP 03828-000 www.each.usp.br

Á minha mãe Ana Rita, meu pai João e meus irmãos Audson, Uini e Rebeca. Dedico cada palavra deste trabalho a vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo folego de vida, por ser meu refúgio e fortaleza, renovar minhas forças continuamente e por ter me concedido a vitória de ter chego até aqui.

Agradeço especialmente a minha mãe Ana Rita esta mulher sábia, de fibra, por ser minha inspiração no que se tange perseverança, foco, doçura e calma diante das aflições cotidianas, por ser um porto seguro, minha amiga e companheira. Pela paciência, orações e palavras ditas que foram o meu combustível nesta empreitada. Ao meu pai João por toda a força que me deu durante este período. Aos meus irmãos Audson, Uini e Rebeca por serem quem são, e animarem meus dias.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Ribamar por todo o conhecimento passado durante estes anos durante minha iniciação científica, TCC e mestrado. Por sua paciência, seus conselhos sobre a vida, ciência e livros. Aqui lhe exprimo a minha gratidão.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Miriam, por caminhar comigo durante o mestrado mostrando a beleza da química e por todos os conselhos dados, disponibilidade e auxílio.

Ao Prof. Dr. Pedro Dias e o Pós Doutor Marcelo Tangerina por toda paciência e dedicação, ao Prof. Dr. Wagner Vilegas por permitir que utilizássemos o seu Espectrômetro de Massas.

Agradeço aos Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde, Prof. Dr. Benedito Corrêa, ao Prof. Dr. Carlos Taborda e a Profa. Dra. Cristina Pungartnik.

Agradeço aos técnicos Rodrigo Lucena, por me auxiliar em muitos momentos no laboratório, a Sandra Pagliari pelas ajudas e ao Clarino que chegou bem no finalzinho do jogo, mas que encabeçou um belo gol de placa.

Agradeço aos colegas do Laboratório do Professor Ribamar, Rafaela, Vittória, Ana, Mônica e Fábio os quais estiveram presentes em muitos momentos importantes da minha vida cientifica até o momento. Em especial ao Dom Fábio, um amigo de longas datas, o qual tenho muita estima e admiração por seu trabalho e pessoa.

Também agradeço a Bia, Fran, Rodrigo, Carla, Renata, Gabriel, colegas e amigos do Laboratório da Professora Miriam, os quais chegaram no meio do jogo, mas, fizeram uma grande diferença em minha vida. Aprendi e aprendo muito com cada um de vocês.

Agradeço aos novos amigos que fiz nesta jornada Karin, Gislaine, Paulo que chegaram de mansinho e permaneceram.

E aos meus amigos Daiane, Gustavo, Felipe, Aline, Romário e novamente meu irmão Audson pelos momentos únicos e divertidos. Vocês são preciosos para mim.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia pela oportunidade dada e as secretárias Fabian e Eliane as quais serei sempre grata por todo o auxílio dado. E a CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

“A scientist in his laboratory is not a mere technician:
he is also a child confronting natural phenomena that
impress him as though they were fairy tales.”
Marie S. Currie

Abstract

SANTOS-LIMA, D. Identification and characterization of active secondary metabolites secreted by the bacterium *Bacillus velezensis* that cause inhibition in the growth of phytopathogenic filamentous fungi. 2018. Number of sheets 79f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Some fungi in agriculture are classified as phytopathogens because they cause various damages to various types of plantations, generating diseases from the roots to their fruits. One of the most used ways to control such pathogens is the use of agrochemicals as fungicides. However, the use of these chemicals in excess entails a number of problems, such as contamination from soil to groundwater, as well as the problems that can directly and indirectly cause human health. Studies show that bacteria of the genus *Bacillus* produce secondary metabolites, which have antifungal activity, among others, thus presenting itself as a potential alternative for the replacement of agrochemicals. The objective of this work was to identify and characterize the secondary metabolites secreted by a *Bacillus velezensis* isolate, with antifungal action against *Trichoderma reesei*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Aspergillus flavus*, *Bothrytis* sp. and *Moniliophthora perniciosa*. The molecular identification of the bacterium isolated on the basis of the sequence of the 16SrDNA region was carried out and the neighbor-joining (NJ) phylogenetic reconstruction method was used to identify the bacterium as *Bacillus velezensis*. Antagonistic assays have shown that the bacterium causes inhibition of growth of the aforementioned fungi. In order to determine the structure of the secondary metabolite responsible for the inhibition of fungal growth, the culture supernatant of the bacterium in BD broth was extracted with chloroform. Using the preparative thin-layer chromatography technique (PTLC) it was possible to obtain a fraction of metabolites which, after analysis by UPLC-MS, proved to be a mixture of compounds. Analysis of this mixture by ESI-CID/MS allowed us to identify three known surfactin molecules with fatty acid chains differing in the number of carbon atoms, in addition to new molecule not yet described in the literature. The supernatant of the culture medium was precipitated with acid, producing a mixture of metabolites whose were fractionated using gel permeation chromatography. This procedure furnished four fractions groups named as FrSph 1, FrSph 2, FrSph 3 and FrSph 4, which were analyzed by UPLC-ESI-IT-MS and ESI-MS^n experiments. These data revealed the concomitant presence of four surfactin molecules previously related with addition of four iturin metabolites family in the FrSph1 fraction. The other side, in the fraction FrSph 2 were observed the same compounds with the predominance of three iturin derivatives and a lower content of two surfactins. The antifungal activity of all fractions groups by agar diffusion with seven different strains showed the greater activity observed for FrSph 1 and FrSph 2 fraction. The FrSph 1 fraction showed activity against *Trichoderma reesei*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Bothrytis* sp. and *Moniliophthora perniciosa*, but not against *Aspergillus flavus* and the FrSph 2 fraction showed activity against *Trichoderma reesei*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, and *Bothrytis* sp., but not against *Moniliophthora perniciosa*. These results revealed the importance of the synergism between surfactin and iturin derivatives to the inhibitory action.

Keywords: *Bacillus velezensis*. Phytopathogenic fungi. Surfactin. Antifungal. Iturin.

RESUMO

SANTOS-LIMA, D. Identificação e caracterização dos metabólitos secundários ativos secretados pela bactéria B*acillus velezensis* que causam inibição no crescimento de fungos filamentosos fitopatogênicos. 2018. N° de folhas 79f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Alguns fungos na agricultura são classificados como fitopatógenos por causarem diversos danos a vários tipos de plantações, gerando doenças desde as raízes até os seus frutos. Uma das formas mais utilizadas para controlar tais patógenos é o emprego de agroquímicos como fungicidas. Entretanto, a utilização destes compostos químicos em excesso acarreta uma série de problemas como, por exemplo, contaminações desde o solo até os lençóis freáticos, além dos problemas que podem ocasionar à saúde do ser humano, direta e indiretamente. Estudos mostram que bactérias do gênero *Bacillus* produzem metabólitos secundários, os quais apresentam atividade antifúngica, entre outras, deste modo, apresentando-se como um potencial alternativa para substituição dos agroquímicos. O objetivo deste trabalho foi de identificar e caracterizar os metabólitos secundários secretados por um isolado da bactéria *Bacillus velezensis*, com ação antifúngica contra a *Trichoderma reesei*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Aspergillus flavus*, *Bothrytis* sp. e *Moniliophthora perniciosa*. Realizou-se a identificação molecular da bactéria isolada com base na sequência da região 16S rDNA e fez-se uso do método de reconstrução filogenética neighbor-joining (NJ), que permitiu identificar a bactéria como *Bacillus velezensis*. Ensaios antagonísticos mostraram que a bactéria provoca inibição do crescimento dos fungos supracitados. Com intuito de determinar a estrutura do metabólito secundário responsável pela inibição do crescimento fúngico, o sobrenadante do cultivo da bactéria em caldo BD foi extraído com clorofórmio. Através da técnica de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi possível obter uma fração de metabólitos que, após análises por UPLC-MS, revelaram-se como uma mistura de compostos. A análise desta mistura por ESI-CID/MS permitiu identificar três moléculas conhecidas de surfactina que apresentam cadeias de ácido graxo diferindo entre si no número de átomos de carbono, além da descoberta da estrutura de uma nova molécula ainda não descrita na literatura. O sobrenadante do meio de cultura foi precipitado com ácido, produzindo uma mistura de metabólitos que foram fracionados usando cromatografia de permeação em gel. Este procedimento forneceu quatro grupos de frações denominados FrSph 1, FrSph 2, FrSph 3 e FrSph 4, que foram analisados por UPLC-ESI-IT-MS e experimentos de ESI-MS^n. Esses dados revelaram a presença concomitante de quatro moléculas de surfactina previamente relatadas com a adição de quatro metabólitos secundários da família da iturina na fração FrSph1. De outra forma, na fração FrSph 2 foram observados os mesmos compostos com predominância de três derivados de iturina e em menor teor duas surfactinas. A atividade antifúngica de todos os grupos de frações foram testadas por difusão em ágar com sete linhagens diferentes e o ensaio revelou a maior atividade observada para FrSph 1 e FrSph 2. A fração FrSph 1 mostrou atividade contra *Trichoderma reesei, Fusarium graminearum, F. oxysporum, F. verticillioides, Bothrytis* sp. e *Moniliophthora perniciosa*, mas não contra *Aspergillus flavus* , já a fração FrSph 2 mostrou atividade contra *Trichoderma reesei*, *Fusarium graminearum, F. oxysporum, F. verticillioides, Aspergillus flavus* e *Bothrytis* sp., mas não contra *M. perniciosa*. Esses resultados revelaram a importância do sinergismo entre os derivados de surfactina e iturina para a ação inibitória.

Palavra-chave: *Bacillus velezensis*. Fungos Fitopatogênicos. Surfactinas. Antifúngico. Iturina.

Lista de Figuras e Tabela

Figura 1: Estrutura da molécula surfactina (A), fengicina (B), iturina (C) e bacilomicina (D).....30

Figura 2: Representação da placa de cromatografia em camada preparativa (CCP).....39

Figura 3: Confirmação da extração do DNA genômico e amplificação do gene 16S rDNA por eletroforese.....42

Figura 4: Árvore filogenética da bactéria *B. velezensis* (em vermelho) baseada na sequência 16S rDNA.....43

Figura 5. Ensaio antagonístico entre *B. velezensis* e *T. reesei* QM9414.....44

Figura 6. Ensaio de atividade antagonistíca entre *B. velezensis* e os fungos fitopatogênicos (A) *Aspergillus flavus*, (B) *Bothrytis* sp., (C) *Fusarium graminearum*, (D) *F. oxysporum*, (E) *F. verticillioides*.....45

Figura 7. Ensaio de atividade antagonistíca entre *B. velezensis* e *M. perniciosa*.....46

Figura 8. Cromatograma dos extratos obtidos dos meios de cultura para crescimento e produção dos metabólitos secundários pela bactéria *B. velezensis*.....46

Figura 9. Análise por CCD e revelação por luz ultravioleta nos comprimentos de ondas de 254 e 365 nm.....47

Figura 10. Análise por CCDC da fração do extrato contendo o princípio bioativos.....48

Figura 11. Placa cromatográfica em escala preparativa para purificação da fração orgânica bioativa.....48

Figura 12. CCD referente ao purificado da fração orgânica de *B. velezensis*.....49

Figura 13. Cromatograma obtido por UPLC-MS da fração orgânica bioativa de *B. velezensis*.....49

Figura 14. Cromatograma obtido por UPLC-MS do íon de m/z1045.....50

Figura 15. Full scan ESI-MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas da fração clorofórmica dos metabólitos de B. velezensis.....50

Figura 16. Experimento MS^2 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de

massas do íon *m/z* 1059.....51

Figura 17. Experimento MS^3 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon de *m/z* 946.....52

Figura 18. Experimento MS^4 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon de *m/z* 833.....52

Figura 19. Experimento MS^5 realizado por ESI-CID/MS ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 717 gerando o pico 618.....53

Figura 20. Experimento MS^3 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon 708 gerando o íon de *m/z* 595.....53

Figura 21. Experimento MS^4 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon produto de *m/z* 595 gerando o pico 481.....54

Figura 22. Experimento MS^5 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo do espectro (35 eV) de massas do íon produto de *m/z* 481 gerando o íon produto de *m/z* 464.....54

Figura 23. Full MS^2 ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon produto de *m/z* 1031.....55

Figura 24. Experimento MS^3 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon produto de *m/z* 918 gerando o íon produto de *m/z* 805 (787) a partir do íon *m/z* 787 a geração do íon de *m/z* 689.....56

Figura 25. Experimento MS^3 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon produto de *m/z* 689 (672) gerando o íon produto de *m/z* 590.....56

Figura 26. Full MS^2 ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 1045.....57

Figura 27. Experimento MS^3 realizado por ESI-CID/MS ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 932 o qual gerou o íon produto de *m/z* 818.....57

Figura 28. Experimento MS^4 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 819. De acordo com a fragmentação obteve-se o íon produto de *m/z* 703.....58

Figura 29. Experimento MS^5 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 703. De acordo com a fragmentação obteve-se o íon produto de *m/z* 605.....58

Figura 30. Experimento MS^3 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 1045. De acordo com a fragmentação por CID obteve-se o seguinte íon produto de *m/z* 693.....59

Figura 31. Experimento MS^4 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 693. De acordo com a fragmentação por CID obteve-se o seguinte íon produto de *m/z* 594.....59

Figura 32. Experimento MS^5 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 594. De acordo com a fragmentação obteve-se íon produto de *m/z* 481 e 463.....60

Figura 33. Full MS^2 ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (32 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 1045. Nova estrutura. Em azul fragmentação da primeira via do anel lactona e em rosa a segunda via de fragmentação.....61

Figura 34. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph1 do precipitado de *B. velezensis*.....62

Figura 35. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph2 do precipitado de *B. velezensis*.....62

Figura 36. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph3 do precipitado de *B. velezensis*.....63

Figura 37. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph 4 do precipitado *de B. velezensis*.....63

Figura 38. Ensaio de difusão em disco com as frações (1) -FrSph1, 2- (FrSph2), 3- (FrSph3), 4- (FrSph4) e C – (Controle DMSO) contra os fungos fitopatogênicos (A) *Aspergillus flavus*, (B) *Botrytis* sp., (C) *M. perniciosa*, (D) *Fusarium graminearum*, (E) *F. oxysporum*, (F) *F. verticillioides* e (G) *T. reesei* QM9414.....64

Tabela 1: Estruturas dos lipopeptídios cíclicos obtidos por ESI-CID/MS.....61

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABCBio - *Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico*

ADAPAR - *Agência de Defesa Agropecuária do Paraná*

Asp – *Aspartato*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CCD - *Cromatografia em Camada Delgada*

CCDP - *Cromatografia em Camada Delgada Preparativa*

CID - *Collision Induced Dissociation*

CNPq - *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico eTecnológico*

CTAB - *Cetrimonium Bromide*

Da - *Dalton*

EMBRAPA - *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*

ESI-MS - *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA – *Food and Drug Administration*

GATe - *Laboratório de Genômica e Elementos Transponíveis*

Glu - *Glutamato*

H_2O - *Água*

UPLC-MS – *Ultra-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

IBAMA - *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis*

Ile – *Isoleucina*

IT – *Ion Trap*

K2P – *Kimura's Two Parameter*

Leu - *Leucina*

m/z- *massa/carga*

MS - *Mass Spectrometry*

MEGA - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

OD_{600} - *Optical Density (Densidade Óptica) a um comprimento de onda de 600nm*

ONU - *Organizações das Nações Unidas*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

Rf - *Fator de Retenção*

SINDIVEG - *Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal*

SINITOX - *Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - Ministério da Saúde/FIOCRUZ*

Val – *Valina*

Sumário

1. INTRODUÇÃO **17**

2. REVISÃO DA LITERATURA **19**

2.1. FUNGOS E SUA AÇÃO **19**

2.1.1. Fungos Fitopatogênicos *19*

2.2. UTILIZAÇÃO DE AGROQUÍMICOS **21**

2.3. ESTRATÉGIAS DE CONTROLE CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS **22**

2.3.1. Controle Biológico *22*

2.3.1.1. CONTROLE BIOLÓGICO BREVE HISTÓRIA **22**

2.3.1.1.1 DATAS HISTÓRICAS DO CONTROLE BIOLÓGICO NO BRASIL **23**

2.3.1.2. DEFINIÇÃO **24**

2.3.1.3. AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO E SUAS INTERAÇÕES **24**

2.3.1.4. TIPOS DE CONTROLES BIOLÓGICOS **26**

2.3.1.5. ESTRATÉGIAS DE LIBERAÇÃO DOS AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO **26**

2.4. COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS **27**

2.4.1. Metabolismo Secundário *28*

2.4.2. Metabólitos Secundários Secretados por Bactérias *28*

2.5. *BACILLUS VELEZENSIS* **30**

3. OBJETIVO **31**

3.1. OBJETIVO GERAL **31**

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS **31**

4. MATERIAIS E MÉTODOS **32**

4.1. MICRO-ORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA **32**

4.1.1. Micro-organismos *32*

4.1.2. Meios de Cultura *32*

4.2. ENSAIOS ANTAGONÍSTICOS *IN VITRO* **32**

4.2.1 Ensaio Antagonísticos entre B. velezensis e o fungo Trichoderma reesei QM9414 ..... *32*

4.2.3. Ensaio Antagonísticos entre B. velezensis e os fungos fitopatogênicos *33*

4.3. OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *B. VELEZENSIS* 33

4.3.1. Meio de cultura para produção de metabólitos secundários 33

4.3.1.1. OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS **.....33**

4.3.1.2. TRIAGENS CROMATOGRÁFICAS **.....34**

4.3.2. Produção dos metabólitos secundários por B. velezensis 34

4.4. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA 35

4.4.1. Extração do DNA 35

4.4.1.1. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE **.....36**

4.4.2. PCR e Purificação 36

4.4.3. Sequenciamento do DNA 36

4.4.4. Qualidade das Sequências, Alinhamento Múltiplo e Análise Filogenética 37

4.5. ANÁLISES QUÍMICAS 38

4.5.1. Obtenção da Fração Orgânica 38

4.5.2. Triagens Cromatográficas 38

4.5.3. Purificação da Mistura de Metabólitos Antifúngicos 38

4.5.4. ESI-MS^n análise 39

4.6. ANÁLISES E FRACIONAMENTO POR PERMEAÇÃO EM GEL 39

4.6.1. Precipitação Ácida. 40

4.6.2. Fracionamento dos Metabólitos Oriundos do Precipitado 40

4.7. UPLC-ESI-IT-MS ANÁLISE 40

4.8. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA COM OS GRUPOS DE FRAÇÕES 41

5. RESULTADOS 41

5.1. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA 41

5.1.1 Extração do DNA Genômico, PCR e Purificação 41

5.1.2. Árvore Filogenética e Identificação Molecular 42

5.2. TESTE ANTAGONÍSTICO 43

5.2.1. Efeito antagonístico de B. velezensis contra Trichoderma reesei QM9414 43

5.2.3. Efeito antagonístico de B. velezensis contra fungos filamentosos fitopatogênicos 44

5.3. ANÁLISES QUÍMICAS **46**

5.3.1. Seleção do meio de cultura para Produção de Metabólitos Secundários pela bactéria *46*

5.3.2. Obtenção da fração antifúngica *47*

5.3.3. Purificação dos compostos presentes na fração orgânica bioativa (FrOrg) *48*

5.4. ANÁLISE POR UPLC-MS E ESI-CID/MS^N **49**

5.4.1. Perfil cromatográfico por UPLC-MS da FrOrg *49*

5.4.2. FULL SCAN ESI-CID/MS DA FrOrg **50**

5.4.2.1. ÍON $[M+NA]^+$ *m/z* 1059 ..... **51**

5.4.2.2. ÍON $[M+NA]^+$ *m/z* 1031 ..... **55**

5.4.2.3. ÍON $[M+NA]^+$ *m/z* 1045 ..... **56**

5.4.2.4. ISÔMERO ÍON *m/z* 1045 ..... **60**

5.5. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DAS FRAÇÕES **62**

5.5.1. Fração Sephadex 1 ..... *62*

5.5.2. Fração Sephadex 2 ..... *62*

5.5.3. Fração Sephadex 3 ..... **63**

5.5.4. Fração Sephadex 4 ..... *63*

5.6. ENSAIO DE DIFUSÃO EM ÁGAR COM OS GRUPOS DE FRAÇÕES **64**

6. DISCUSSÃO **65**

7. CONCLUSÕES **69**

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: **70**

APÊNDICE 1 ..... **79**

1. INTRODUÇÃO

Problemas com cultivo de alimentos tem sido algo constante na agricultura. Segundo SUPRAP (2012) as plantações estão expostas a cerca de 70.000 espécies de patógenos o que diminui em 40% a produção dos alimentos. Dentre os vários tipos de patógenos que atacam as plantas temos os fungos. Estes micro-organismos quando geram algum tipo de doença nas plantas são denominados como fungos fitopatogênicos. A ação destes fungos, pode promover várias complicações no desenvolvimento das lavouras gerando danos às folhas, frutos, sementes, caules, raízes e ao sistema vascular da planta além do apodrecimento, portanto, diminuindo a qualidade dos produtos (SILVA, 2013), além de causarem doenças nos animais e seres humanos. Em função desta problemática, os fungos tornaram-se objetos de muitos estudos na procura de métodos para um controle dos mesmos.

Na agricultura, embora sejam atraentes os resultados que a utilização dos agroquímicos (pesticidas, agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas, entre outros) trazem no cuidado com as lavouras, há uma preocupação que se levantou nos últimos anos sobre a utilização dos mesmos, levando à produção de alimentos sem a utilização dos agroquímicos ou que seu uso adequado fosse comprovado (MORANDI & BETTIOL, 2009).

Alguns dos agroquímicos mais empregados para controle dos efeitos dos fungos sobre a agricultura são: ABACUS HC utilizado em lavoura de algodão, milho, soja e outros; BIM 750 usado em lavouras de arroz, arroz irrigado e tratamento de sementes; CARBOMAX 500 SC usado em lavouras de feijão, soja e citros; SIMBOL 125 SC usado em lavouras de trigo, aveia e café; Cobre ATAR BR utilizado nas plantações de abacate, amendoim, citros, goiaba e cacau, entre outros (ADAPAR - Agência de Defesa Agropecuária do Paraná). Entretanto, os agroquímicos têm gerado graves problemas. Entre 1999 e 2009 a SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - Ministério da Saúde/FIOCRUZ) notificou que cerca de 60 mil pessoas sofreram intoxicações agudas (BOMDARDI, 2011) causadas por compostos utilizados no combate de pragas da agricultura. Embora alguns outros métodos para reduzir os efeitos dos micro-organismos nas lavouras sejam empregados, tais como a não utilização de agroquímicos ou o seu uso de forma controlada, é de grande relevância encontrar uma forma de controle para os fungos a qual a utilização de agroquímicos seja descartada. Deste modo, colaborando para que os prejuízos ao meio ambiente e ao ser humano sejam minimizados. Assim, em estudos realizados com esse propósito, descobriram-se que determinadas bactérias secretam compostos, denominados metabólitos secundários, os quais podem influenciar no desenvolvimento de alguns tipos de fungos, nematoides e até mesmo de outras bactérias, demonstrando-se um bom potencial biotecnológico, além de não causar prejuízo aos seres humanos (BENITEZ et al., 2012). Desta maneira, o estudo referente à identificação e caracterização de moléculas do metabolismo secundário de bactérias, que apresentam atividade contra patógenos de plantas é extremamente importante, dado que tais moléculas podem substituir os agroquímicos, agindo com a mesma potencialidade ou até maior, porém

não causando danos ao meio ambiente e a ser humano.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fungos e sua ação

Os fungos são bastante utilizados em alguns setores como na área farmacêutica, da alimentação entre outras. Os cogumelos são um exemplo de fungos amplamente empregados na alimentação humana. Há fungos que são empregados nos processos de produção de alguns alimentos como, por exemplo, leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que são utilizadas na fermentação de pães, produção de vinhos, rum, uísques (PELCZAR Jr. *et al.*1996*)* e cervejas. Estas leveduras são usadas também em outros processos industriais como o processo de fermentação para produção de biocombustível, convertendo o açúcar obtido da cana-de-açúcar em etanol (RAW *et al.* 2001). Na área farmacêutica, destaca-se o fungo *Penicillium chrysogenum* ou *P. notatum*, o qual trata-se de um bolor produtor do β-lactâmico penicilina (TRABULSI & ALTHERTUM, 2008). Ainda neste mesmo âmbito, tem o gênero do fungo antigamente conhecido como *Cephalosporium* e atualmente reconhecido como *Acremonium*, o qual é responsável pela produção do antibiótico cefalosporina (TRABULSI & ALTHERTUM, 2008). Apesar dos inúmeros benefícios inerentes a estes micro-organismos, existem, em contrapartida, alguns fungos que podem acarretar danos ao homem, animais e à agricultura (WONG et al., 2008). Ao homem e animais, por exemplo, temos as espécies de fungos dimórficos como *Histoplasma capsulatum* que causam micoses sistêmicas como a histoplasmose, uma doença que afeta os pulmões e o sistema reticuloenotelial que atinge humanos e animais (GÓMEZ,2011). O fungo geofílico dimórfico *Sporothrix schenckii*, responsável pela micose subcutânea denominada esporotricose, a qual ataca os animais e o homem (SILVA et al., 2012). Algumas espécies do gênero *Aspergillus*, em especial a espécie *A. fumigatus*, podem causar a infecção no trato respiratório denominada aspergilose, a qual refere-se a uma doença oportunista que ataca principalmente os pulmões entre outros tipos de fungos (BEISSWENGER et al, 2012). Já na agricultura os fungos são classificados como fitopatógenos por causarem diversos prejuízos a vários tipos de cultura de lavouras gerando doenças desde as raízes até os seus frutos (DIAS, 2011).

2.1.1. Fungos Fitopatogênicos

O termo fitopatologia origina-se de três palavras gregas (phyton = planta; pathos = doença; logos = estudo), tratando-se portanto, do estudo de doenças em plantas. Dentre os agentes causais das patogênias em plantas os fungos são um dos agentes causais mais importantes (CAROLLO & FILHO, 2016).

A maioria das doenças em plantas advém da interação entre a planta (hospedeiro) e o fungo (parasita). Segundo KNOGGE (1996) cerca de 10% de todos os fungos conhecidos podem colonizar

plantas, contudo, os fungos fitopatogênicos representam uma porção muito pequena frente a grande reino Fungi (KNOGGE, 1996). A maioria dos fungos são decompositores, utilizando os restos de plantas e outros organismos como fonte de alimento. Os fungos fitopatogênicos desempenham o papel dominante não apenas por causar epidemias devastadoras, mas também pelas perdas de rendimento anuais. Por serem persistentes e significativos, os fungos fitopatogênicos são reconhecidos como sendo um sério fator econômico, atraindo assim, a atenção de agricultores, criadores de plantas e cientistas (KNOGGE, 1996).

Uma grande parte dos fungos fitopatogênicos apresentam um ciclo de vida no qual tais fungos vivem durante um período em uma planta hospedeira e, em outro no solo ou mesmo em restos vegetais. Algumas espécies apresentam um ciclo de vida completamente em planta hospedeira e apenas seus esporos são depositados no solo até o momento que sejam levados (pelo vento, água etc.) a um hospedeiro, para que ocorra a germinação e reprodução, enquanto outras espécies vivem parte de seu ciclo de vida como parasita de plantas e outra parte de seu ciclo como saprófitas de solo (CAROLLO & FILHO, 2016).

Dentre os fitopatógenos que prejudicam as lavouras encontram-se os fungos, tais como os pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Moniliophthora* e *Aspergillus* (DIAS, 2011) entre outros. Estes patógenos são amplamente estudados devido aos prejuízos que causam às folhas, frutos, sementes, caules, raízes, ao sistema vascular da planta, assim como o apodrecimento do colo de plantas adultas ocasionando a morte das mesmas (DIAS, 2011).

Espécies do gênero *Fusarium* desenvolvem-se no solo e apresenta alta patogenia em plantas, por causar murcha ou amarelecimento e podridão das sementes (NUNES, 2003); *Botrytis spp.* prejudicam as fases de desenvolvimento da planta e promovem uma série de patogenias como o apodrecimento dos frutos, podridão do bulbo da planta, secura e queda das folhas (DIAS, 2011); espécies do gênero *Aspergillus* por sua vez, causam podridão do fruto (LIMA, 2002). O fungo *M. perniciosa* ataca tanto os ramos jovens como flores e frutos. A forma como ataca a planta é dividida em dois estágios. No primeiro estágio do desenvolvimento do fungo na planta, sua ação agride os tecidos meristemáticos da planta levando à perda da dominância apical, ocasionando a superbrotação denominada vassoura verde, além de gerar deformidades nos frutos e flores. No segundo estágio de desenvolvimento promove a necrose, apodrecimento e morte das regiões atingidas pelos micélios do fungo (DARWICHE, et al., 2017; FORMIGHIERI, 2006).

Uma das maneiras mais empregadas para minimizar a ação destes fungos nas lavouras é a utilização dos agroquímicos. A utilização destas substâncias demonstra-se, em determinado ponto, importante para conter as pragas além de contribuir para o aumento e geração de produtos comercias de qualidade, tornando-se um item de suma importância no momento do planejamento do plantio; entretanto, estes produtos também podem ocasionar problemas graves (DIAS, 2011).

2.2. Utilização de Agroquímicos

O rápido desenvolvimento na produção de alimentos no Brasil releva um possível aumento para os próximos anos, desta maneira, influenciando significativamente na economia nacional (SILVA, 2013). Todavia, a forma de produção destes alimentos tem gerado problemas. Em particular, dependendo do modo como é feito o controle referente às pragas e doenças que afetam a lavoura, pode-se obter desde bons resultados até àquelas condições que podem ser prejudiciais à qualidade do alimento.

O Brasil encontra-se entre os maiores consumidores de agroquímicos no mundo segundo o relatório apresentado pela FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) de 2015, revelando assim que o consumo de fertilizantes e produtos químicos agrícolas no Brasil tem se intensificado. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2009 o país consumiu cerca de 1 milhão de toneladas de agrotóxico o que corresponde a cerca de 5,2 Kg de agroquímico por pessoa no país. Entre os anos de 2001 e 2008 o Brasil vendeu cerca de R$ 7 bilhões de reais em agroquímicos e no ano de 2011 alcançou a marca de R$ 8,5 bilhões de reais em vendas (SINDIVEG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal).

O relatório de 2017 apresentado pela ONU (Organização das Nações Unidas) para os Direitos Humanos que tratou da questão alimentar, levantando a problemática da utilização excessiva de pesticidas e outros produtos químicos no tratamento das lavouras, onde menciona-se os prejuízos à saúde causado tanto pelo contato direto com os agroquímicos quanto o contato indireto pela ingestão destes agroquímicos através dos alimentos, por se acumularem e permanecerem no organismo.

Segundo a SINITOX, entre 2010 e 2011, o número de mortes por contato direto (intoxicação) com os agroquímicos chegou a 1.500 casos; já em 2012, notificou-se que cerca de 34% das mortes por intoxicações humanas por agentes tóxicos foram causadas por agrotóxicos e no ano de 2016 o número de mortes pela mesma causa subiu 6% totalizando 40%.

O uso exacerbado de defensivos agrícolas para controle das pragas e doenças em lavouras também tem acarretado uma série de problemas ambientais e sociais como a contaminação de lençóis freáticos, bacias hidrográficas, e do próprio solo, além da extinção de micro-organismos importantes para a ciclagem dos nutrientes no solo e da seleção de cepas que apresentam resistência aos defensivos agrícolas utilizados (SILVA, 2013).

O emprego dos agroquímicos tem despertado na sociedade uma preocupação que levou o mercado agrícola a repensar suas formas e estratégias de cultivo. Essa nova conduta poderá incluir a extinção do uso dos agroquímicos ou o estabelecimento de um controle mais rigoroso da utilização destes compostos (MORANDI & BETTIOL, 2009).

2.3. Estratégias de Controle contra Fungos Fitopatogênicos

Existem várias estratégias para o controle dos fungos fitopatogênicos sendo utilizadas para evitar ou diminuir a utilização de agroquímicos através de técnicas como a rotação de cultura, a qual consiste na alternância anual das espécies vegetais em uma mesma área (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 2004); introdução de material orgânico no solo (REIS e FORCELINI, 1995; AMBRÓSIO et al., 2008); termoterapia (SINCLAIR, 2003), na qual as sementes são tratadas com calor úmido (vapor, água quente) ou calor seco, em temperaturas que variam de 50 a 85 °C, por 11 dias (SILVA et al., 2002), e após são semeadas. Contudo, nem sempre essas estratégias são eficazes no controle de tais patógenos, levando os agricultores a empregar como meio de controle de pragas e doenças os defensivos químicos, os quais acabam se tornando indispensáveis para obtenção de uma maior produtividade e qualidade do produto proveniente do agronegócio (KIMATI,1995). Todavia, uma estratégia recente que tem colaborado para a diminuição do uso dos agroquímicos é o Controle Biológico realizado por intermédio de micro-organismos. Este tipo de método tem sido bastante estudado e tem apresentado resultados satisfatórios (MORANDI & BETTIOL, 2009).

2.3.1. Controle Biológico

2.3.1.1. Controle Biológico Breve História

A história do controle biológico inicia-se com a utilização de formigas (*Oecophylla smaragdinai)* como instrumentos de controle pelos chineses com o objetivo de controlar lepidópteros e coleobrocas de citrus no século III a.C. (Van den BOSH et al., 1982). Em 2.200 a.C. os egípcios já se referiam a doenças em abelhas, assim como gregos e chineses mais tardiamente referiram-se as doenças que ocorriam com o bicho da seda e abelhas (GONÇALVES, 1996). No século XVIII várias tentativas para controle biológico foram feitas, no entanto, o sucesso com estas tentativas vieram apenas no século XIX, com a introdução da "joaninha" (*Rodolia cardinalis*) importada da Austrália para Califórnia para controlar o "pulgão branco" (*Icerya purchasi*). Os resultados satisfatórios deste método foram observados após dois anos da liberação da "joaninha". Este tipo de controle foi um marco no controle biológico por sua efetividade como controle de pragas (GALLO et al., 1978; GRAVENA, 1992; PARRA et al.2002). No ano de 1830 micro-organismos como fungos e a posteriore as bactérias e protozoários, foram classificados como agentes (pragas) causadores de doenças em insetos. Em 1870, com este conhecimento, realizaram a primeira tentativa de utilizar tais agentes para controle de insetos (GALLO et al., 1978).

Em diferentes países entre os anos de 1890 e 1975 mais de 150 programas de controle biológico apresentaram resultados satisfatórios (STEHR, 1975; Van den BOSH et al., 1982). Neste ínterim, na Alemanha, foi descoberta a bactéria *Bacillus thuringiensis* a partir da traça de farinha (*Anagasta kuehniella*) por Ernst Berliner. Esta começou a ser utilizada como inseticida e comercializada como

produto na França em 1938 e nos Estados Unidos por volta de 1950 (BRAR et al., 2006; CAPALBO et al., 2004)

Somente no fim do século XIX que o controle biológico foi visto como método científico, pois somente ao final do mesmo é que os conceitos referentes aos processos evolutivos, a questão da luta pela sobrevivência, pressão populacional surgiram para que assim, dessa orientação para o conceito de controle biológico (HUFFAKER & MESSENGER, 1976).

2.3.1.1.1 Datas Históricas do Controle Biológico no Brasil

O controle biológico é bastante recente no Brasil. Seu início data da década de 50 com a primeira publicação feita pelo Dr. Reinaldo Foster pesquisador do Instituto de Agronomia de Campinas. Seu trabalho tratou da paralisação do vírus mosaico por intermédio do filtrado de *Trichoderma sp.* No ano de 1960 Pigatti e colaboradores realizaram a aplicação de *B. thuringiensis* para controlar lagarta de mandioca (MORANDI & BETTIOL, 2009). Em 1966 utilizam o fungo *Metarhizium anisoplíae* como controle de "cigarrinha" das folhas no nordeste do país (GONÇALVES, 1996). Na década de 70 criou-se no curso de Pós-Graduação de Entomologia na ESALQ-USP, uma disciplina voltada para a patologia de insetos dando o ínicio nesta área no país (GONÇALVES, 1996). Nesta mesma década o Instituto Biológico do Estado de São Paulo, inicia a multiplicação e repasse do parasitoide *Neodusmetia sangwani* para controle de conchonilha (*Antonina graminus*), o qual havia sido trazido para o Brasil na década de 60 (FILHO & SILVA, 1988).

Entre os anos de 1986 e 1987 aconteceram as primeiras Reuniões Brasileiras em Piracicaba - São Paulo, sobre o Controle Biológico de Doenças de Plantas, desta forma assinalando a formação desta área no Brasil. Também no ano de 1987 liberou-se o primeiro biocontrole oriundo de *Trichoderma viride*. Tal fungo produz metabólitos secundários que causam inibição no crescimento de outros fungos filamentosos (DIKSHIT et al. 2011). O biocontrole foi fornecido comercialmente pelo Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado da EMBRAPA (MORANDI & BETTIOL, 2009).

Na década de 90, muitos fatos referentes a evolução e estabelecimento do Controle Biológico ocorreram, como é o exemplo da aplicação do fungo do gênero *Acremonium* para controle da lixa de coqueiro pela empresa Maguari S.A., em 1990. No ano de 1991 houve a primeira publicação de um livro com o tema Controle Biológico intitulado “Controle Biológico de Doenças de Plantas”, publicado pela EMBRAPA. No ano seguinte houve a primeira realização de apresentações orais específicas para o tema, durante o XXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia ocorrido em Gramado, e mesmo ano criou-se a primeira disciplina de pós-graduação voltada para o tema do Controle Biológico pelo pesquisador da EMBRAPA, Dr. Wagner Bettiol da Universidade Estadual Paulista-UNESP/Botucatu, denominada “Controle Biológico de Doenças de Plantas”, além da primeira empresa especializada na produção e comercialização de *Trichoderma sp.* para controle biológico denominada BIOAGRO ALAM Ltda. Em

03 de novembro de 1997 foi publicada pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) a portaria 131 que estabeleceu critérios e procedimentos para registros e avaliação ambiental de agentes microbianos empregados na defesa fitossanitária (MORANDI & BETTIOL, 2009).

Nos anos 2000 foi fabricado o fungicida Tricovab® a partir de *Trichoderma stromaticum* com a finalidade de controlar "vassoura de bruxa" de cacaueiro. Em 2007 foi criada a Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico – ABCBio e um ano depois foi realizado o primeiro registro de um fungicida de origem biológica para uso comercial com registro denominado Trichodermi®, o qual apresenta em sua formulação um antagonista para controle de doenças de plantas. E durante o ano de 2009 foi disponibilizado para o comércio mais de 20 produtos para controle de fitopatógenos, além de vários cursos de pós-graduação e a aprovação pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico eTecnológico) para projetos voltados a definição de metodologias e avaliação de produtos biológicos para controle de doenças de plantas (MORANDI & BETTIOL, 2009). Desde então, não somente fungos do gênero *Trichoderma* têm sido estudados e utilizados como controle biológico, mas outros organismos também têm apresentado potencialidades para este tipo de aplicação devido aos compostos produzidos por estes micro-organismos.

2.3.1.2. Definição

O controle biológico trata-se do uso de populações de parasitoides, predadores, patógenos, antagonistas ou competidores para suprimir uma população de pragas, a tornando menos abundante e, por consequência, menos prejudicial do que seria (Van DRIESCHE & BELLOWS 1996). Este termo foi utilizado pela primeira vez pelo pesquisador Harry S. Smith (1919) para representar o uso de inimigos naturais (introduzidos ou manipulados) para controlar pragas de insetos.

Segundo WILSON & HUFFAKER (1976) vários pesquisadores ao longo dos anos, em destaque os entomologistas, têm definido este tipo de controle. DEBACH (1964) define controle biológico sendo a ação de parasitos, predadores e patógenos que mantém a densidade populacional de outros organismos em uma média mais baixa do que ocorreria em sua ausência. Já Van den BOSH *et al.* (1982) estabelece que controle biológico se trata da regulação do número de plantas e animais por inimigos naturais ou, simplesmente, o restabelecimento do balanço da natureza. E CALTAGIRONE (1988) considera que o controle biológico é a regulação de populações de organismos vivos resultantes de interações antagonísticas como parasitismo, predação e competição.

2.3.1.3. Agentes de Controle Biológico e suas Interações

Os inimigos naturais que atuam como agentes de controle biológico são divididos em dois grupos. O primeiro como os agentes entomófagos e o segundo como os agentes entomopatogênicos. Faz

parte do primeiro grupo os predadores e parasitóides, já do segundo grupo os patógenos. Os agentes entomófagos são aqueles insetos que se alimentam de outros insetos. Os inimigos naturais pertencentes a este grupo devem apresentar como particularidade: ser um predador ou parasita de um hospedeiro ou presa específico; flexibilidade as mudanças do meio ambiente; capacidade de multiplicar-se frente ao seu hospedeiro ou presa; apresentar sincronização sazonal com seu hospedeiro ou presa; resistência nos períodos de ausência de seu hospedeiro ou presa entre outros. Os agentes entomopatogênicos são micro-organismos (patógenos) que são utilizados como controle de insetos (hospedeiros) (FILHO & CIOCIOLA, 2002).

Uma outra forma de interação entre agentes biológicos e as pragas é a competição. A competição trata-se da interação entre indivíduos da mesma espécie ou entre indivíduos de espécies diferentes que dependem de um determinado recurso (alimento, território) em comum, sendo este recurso encontrado em quantidades limitadas, ou seja, a competição é uma relação desarmônica na qual uma espécie afeta outra de forma a impedir que ela chegue ao recurso. A competição é dividida em competição interespecífica, quando acontece entre indivíduos de espécies diferentes e intraespecífica quando acontece entre indivíduos da mesma espécie (CONNELL, J. H. 1983; RAVEN et al, 1996).

Competição interespecífica é subdividida em relações sendo a primeira relação interespecífica denominada relação harmônica. Esta refere-se a relações onde as duas espécies são beneficiadas como, por exemplo, na protocooperação onde as espécies se beneficiam uma com a presença da outra, contudo, não são dependentes uma da outra; mutualismo que consiste na relação das duas espécies de tal forma que elas não conseguem viver uma sem a outra; o inquilinismo trata-se de uma relação onde uma determinada espécie (inquilina) obtém vantagens a partir de outra espécie (hospedeiro) para sua proteção, transporte ou até mesmo suporte de maneira que não cause prejuízos a nenhuma das espécies envolvidas e o comensalismo é a relação entre espécies que uma beneficia-se com os restos alimentares da outra (CONNELL, 1983; TOWNSEND et al., 2008).

A relação interespecífica secundária é denominada como relação desarmônica esta ocorre quando duas espécies distintas convivem em uma mesma comunidade, todavia, competem pelos recursos como, por exemplo, o parasitismo, este consiste em uma relação onde o parasita associa-se a um hospedeiro de forma a prejudicá-lo, pois, retira de seu hospedeiro recursos para sua sobrevivência; também há o predatismo que consiste em uma relação cuja qual uma espécie caça, mata e alimenta-se de outra espécie; a herbivoria assemelha-se ao predatismo, contudo, nesta a espécie herbívora extrai recursos de partes vivas de uma planta e por fim o amensalismo ou antagonismo é uma relação cuja qual uma espécie prejudica o desenvolvimento de uma espécie secundária com o propósito de adquirir benefícios em relação aos recursos disponíveis. Este prejuízo é causado ou por inibição no crescimento da espécie competidora ou sua reprodução (MORANDI et al., 2009; TOWNSEND et al., 2008).

2.3.1.4. Tipos de Controles Biológicos

Controle biológico é dividido em Controle Biológico Clássico, Controle Biológico Natural e Controle Biológico Aplicado. Cada uma destas divisões apresenta um tipo de característica distinta:

- Controle Biológico Clássico refere-se ao intercâmbio e colonização de agentes naturais para controle das pragas, são liberados de forma inoculativa. Estes agentes podem ser importados de um país para outro ou de uma região para outra, com intuito de promover um equilíbrio frente a praga (GRAVENA, 1992 & PARRA et al.2002).

- Controle Biológico Natural segundo SILVA & BRITO (2015) trata-se do controle que acontece naturalmente nos diferentes agroecossistemas de forma a estabelecer o equilíbrio natural, o qual as pragas, presentes em um dado ambiente, são conservadas em uma densidade abaixo do que ocorrem naturalmente (DEBACH & ROSEN, 1991; PARRA et al.2002).

- Controle Biológico Aplicado segundo PARRA *et al*. (2002) consiste na liberação inundativa dos agentes naturais (predadores, parasitóides, patógenos) após serem criados em grandes quantidades em laboratório, com o objetivo de diminuir rapidamente a população de pragas, visando o estabelecimento do equilíbrio.

2.3.1.5. Estratégias de liberação dos agentes de controle biológico

A forma de liberação dos agentes de controle biológico segundo WILLIAMS & LEPPLA (1992) ocorrem das seguintes formas:

- Liberação inoculativa: este é um sistema aberto que apresenta baixa variabilidade ao longo do tempo. Esta é bastante aplicada contraculturas perenes ou semiperenes e florestas. E é característica do controle biológico clássico;

- Liberação inundativa: trata-se de culturas criadas massalmente em laboratório e são liberados com regularidade e em grandes quantidades para que seu efeito seja imediato.

- Liberação inoculativa estacional ou sazonal: ocorre em locais específicos como casas de vegetação, em cultivos de curta duração, no momento em que a praga estiver atacando. São liberados um número considerável de agentes naturais com o foco de um controle rápido, assim como, de um crescimento da população do agente de controle durante o período do cultivo. Assemelha-se a liberação inoculativa (PARRA et al., 2002).

2.4. Compostos Antifúngicos

Vários compostos apresentam potencialidades na inibição de micro-organismos, desde lipopeptídios não ribossomais até algumas proteínas, as quais são produzidas por uma grande variedade de organismos como as bactérias, o ser humano, outras espécies de vertebrados, invertebrados, plantas e fungos (WONG et al. 2008; WILLIAM et. al. 1989)

Existe uma gama de proteínas antifúngicas que foram estudadas como, por exemplo, as glucanases, um tipo de proteína antifúngica obtida de planta (VIGERS et al. 1991). Esta proteína foi encontrada na espécie *Jatropha curcas*, a qual é oriunda de regiões de climas extremos (WEI *et al.* 2005); outra proteína é a proteína análoga a proteína taumatina, a qual apresenta a sequência de aminoácidos altamente similar à da proteína taumatina obtida da planta *Thaumatococcus daniellii*, encontrada no oeste da África. No entanto, a proteína análoga à proteína taumatina, embora seja bastante semelhante estruturalmente, não é doce ao paladar, todavia apresenta atividade inibitória contra fungos, diferentemente da proteína taumatina obtida de *T. daniellii*, a qual é doce ao paladar, e não apresenta nenhuma atividade inibitória (Ho et al. 2007). Estas proteínas análogas a taumatina são produzidas por algumas monocotiledôneas como cevada, trigo, sorgo e aveia, e tem capacidade de inibir o crescimento micelial dos fungos *Fusarium oxysporum e Mycosphaerella arachidicol* (Ho et al. 2007; WONG et al. 2008).

Também existe alguns antifúngicos de origem semi-sintética, os quais são oriundos da fermentação de vários fungos como, por exemplo, *Coleophoma empedri*, *Aspergillus nidulans* e *Glarea lozoyensis*. Os produtos produzidos por estes fungos são denominados equinocandinas. No entanto, inicialmente foi nomeada como pneumocandinas por apresentar atividade *in vitro* contra espécie *Pneumocystis jiroveci* e espécies de *Candida* (CORTÉS & RUSSI, 2011; MORRIS & VILLIMANN, 2006). As equinocandinas fazem parte da classe de medicamentos antifúngicos que são amplamente utilizados para tratamento de micoses humanas. São hexapeptídeos cíclicos compostos com grupos linoleoil que acila o terminal *N* do peptídeo cíclico, e o grupo amino que conecta a 3-hidroxi-4-metil-prolina ao grupo δ-amino do di-idroxioritina a forma de anel (MORRIS & VILLIMANN, 2006). As equinocandinas são compostas pelas seguintes moléculas: anidulafungina, primeira molécula a ser isolada desta classe e terceira a ser liberada pela FDA – Food and Drug Administration para uso em humanos; caspofungina, primeira molécula da classe a ser liberada para uso em humano e a micafungina segunda a ser liberada par uso em humano (CORTÉS & RUSSI, 2011).

Estudos focados na produção de metabólitos secundários ativos têm sido realizados. A literatura mostra que alguns tipos de metabólitos secundários apresentam potencialidades no controle de vários micro-organismos, incluindo fungos fitopatogênicos (WONG et al. 2008).

2.4.1. Metabolismo Secundário

O metabolismo primário pode ser definido como o conjunto de processos e reações químicas presente em todos os organismos existentes, os quais geram energia essencial para o desenvolvimento (PETRY, 2015; VINING, 1986).

O metabolismo secundário, depende dos produtos advindos do metabolismo primário para geração de seus produtos e não apresenta um papel de importância direta no desenvolvimento dos organismos. Esta via metabólica permite a produção de compostos ativos ou não, e sua produção se dá no período da fase estacionária como também pode ser produzido durante o crescimento do organismo (VINING, 1986).

Para alguns micro-organismos os metabólitos secundários apresentam um fator importante na formação de esporos, pois, a regulação da produção tanto de conídios quanto dos metabólitos secundários se dá por fatores semelhantes, propiciando a geração dos metabólitos durante a esporulação; e isso permite retardar a germinação dos conídios até que haja um ambiente com melhores condições de crescimento e menor competição por nutrientes. Estes metabólitos secundários ativos desempenham um papel de limpeza do ambiente frente aos micro-organismos concorrentes no período de germinação dos conídios (DEMAIN & FAING, 2000).

Como sugerido por DETHIER (1954) e FRAENKEL (1959), o metabolismo secundário apresenta um papel de defesa contra patógenos e contra a herbivoria, predação de partes não reprodutivas de plantas. Segundo WHITTAKER (1975) os aleloquímicos pelos quais um organismo de uma espécie afeta um organismo de outra espécie, são definidos como um subconjunto de metabólitos secundários. Alguns metabolitos secundários apresentam outras funções, por exemplo, proteção contra raios ultravioletas, tolerância à dessecação, transporte de metais entre outros (STAMP, 2003). Alguns desses compostos têm sido empregados no controle biológico de algumas pragas.

A literatura descreve vários estudos indicando a produção de compostos metabólitos antifúngicos por bactérias, plantas e alguns fungos (BENITEZ et al., 2012; FUENTES 2004; GARRIGUES et al., 2016). Esses compostos metabólitos bioativos são moléculas biodegradáveis e muito menos nocivas ao meio ambiente (BENITEZ et al., 2012), assim atuando como um biocontrole de menor impacto ambiental. Estudos realizados demonstraram que bactérias produzem metabólitos com propriedades antifúngicas de bastante eficácia (BENITEZ, 2010; BENITEZ et al., 2012).

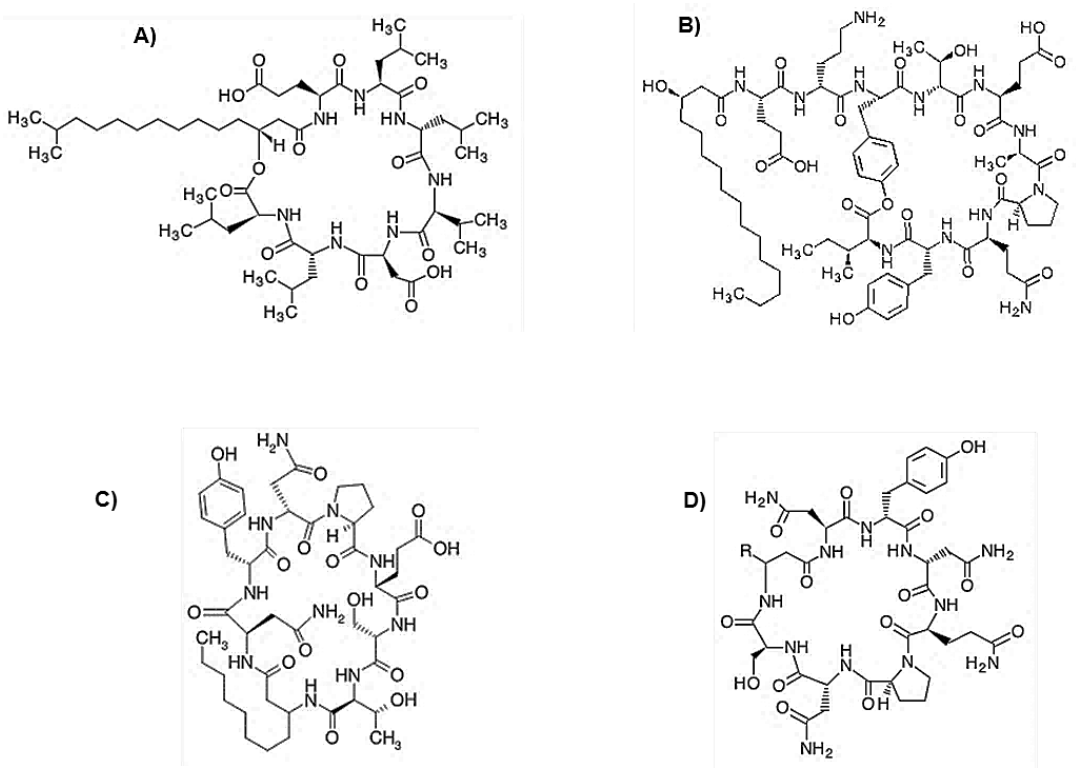
2.4.2. Metabólitos Secundários Secretados por Bactérias

As bactérias são reconhecidas pela produção de metabólitos secundários com ação antibiótica. A grande vantagem da possível obtenção destes antibióticos a partir destes micro-organismos está na eficácia que apresentam no tratamento contra fungos (BENITEZ, 2010; BENITEZ et al. 2012).

A literatura tem mostrado que determinadas bactérias produzem compostos que influenciam no crescimento de fungos fitopatogênicos, uma delas são as bactérias do gênero *Bacillus*. Este gênero pertence à família Bacillaceae, apresentam a forma de bastonetes; são gram-positivos, facultativos aeróbios, catalase positivos e produtores de endósporos (MADIGAN et al., 2010). Existem catalogadas até o momento cerca de 268 espécies deste gênero, além de cerca de 7 subespécies (EUZEBY, 1997), as quais têm sido amplamente estudadas por produzirem metabólitos secundários de amplo espectro de atividade antifúngica (YAN et al., 2012) que são produzidos ou pela via NPSP- Nonribosomal Peptide Syntasis Pathway ou pela via do PKS – Polyketide Synthase (BENITEZ et al. 2012; WONG et al., 2008; WONG & NG, 2009).

Alguns destes lipopeptídios foram identificados e caracterizados, e, em particular, destacam-se a iturina A, bacilomicina, bacilopeptina, fengicina e surfactina (Figura 1). Iturina A, bacilomicina e bacilopeptina são metabólitos secundários oriundos de uma mesma família, denominada Iturina. A família da Iturina apresenta estrutura similar, sendo sua estrutura um pentapeptídio cíclico com um ácido graxo contendo de 14 a 17 átomos de carbono. Iturina A apresenta uma fungitoxidez da qual se fundamenta na perturbação osmótica criada devido à formação de poros que conduzem íons. Com relação ao mecanismo de ação das iturinas, MAGET-DANA & PTAK (1990) propõem que as moléculas de iturina alcancem e penetrem a membrana citoplasmática da célula-alvo e desorganizem a bicamada lipídica ativando as fosfolipases. Dentro da membrana, elas formam estruturas condutoras de oligômeros (agregados de lipopeptídeos ou agregados do complexo lipopeptídeo-fosfolípido) que estão aumentam com o passar do tempo e permitem o vazamento de K^+ intracelular. A família da surfactina refere-se àquelas moléculas formadas por um heptapeptídeo ligado a uma cadeia de ácido graxo contendo entre 13 a 16 átomos de carbono. Uma das atividades associadas à esta família é de causar alteração na membrana fosfolipídica devido às interações fortes que estabelecem com a membrana, além de serem poderosos surfactantes, por terem a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m em uma concentração tão baixa quanto 0,005%, além de apresentar potente atividade antiviral, antimicoplasma, antitumoral, anticoagulante e bem como inibições enzimáticas. E, finalmente a família da fengicina, refere-se a lipodecapeptídio cíclicos ligados a uma cadeia de ácido graxo contendo entre 14 a 18 átomos de carbono (saturados ou insaturados), apresentando uma forte ação contra fungos filamentosos. As fengicinas diferem das iturinas e surfactinas pela presença de aminoácidos incomuns, como ornitina e alo-treonina. A variação da posição 6 no anel peptídico em Ala-Val permite diferenciar as estruturas das moléculas pertencentes à família da fengicina em Fengicina A e B e Plipastatina A e B (ALVAREZ, 2011; JEMI et al., 2017; MNIF & GHRIBI, 2015; ONGENA et al., 2005; YAN et al., 2012).

Figura 1: Estrutura da molécula surfactina (A), fengicina (B), iturina (C) e bacilomicina (D). (MONGKOLTHANARUK, 2012).



2.5. *Bacillus velezensis*

Estudos mostraram que *B. velezensis* era considerado um sinônimo heterotípico de *B. amyloliquefaciens* (DUNLAP et al., 2016). O sequenciamento e análises do genoma, morfológia, fisiológia, quimiotaxonômia e filogenética de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42, *B. methylotrophicus*, *B. oryzicola* mostraram que estas espécies compartilham do mesmo fenótipo e genótipo que a espécie *B. velezensis*. Assim, estas espécies deverão ser reclassificadas como sinônimos heterotípicos de *B. velezensis*, já que esta foi a primeira a ser descrita na literatura (DUNLAP et al., 2016).

De acordo com RUIZ-GARCÍA e colaboradores (2005) *Bacillus velezensis*, é assim denominado por ter sido isolado pela primeira vez do rio Vélez em Málaga, sul da Espanha. Trata-se de uma bactéria gram positiva e é classificada morfologicamente como um bacilo. É produtora de endósporos, os quais são elipsoidais e encontram-se em posições paracentrais ou subterminais. Não contêm cristais paraesporais ou acumulam ácido poli-hidroxibutírico. Sua motilidade ocorre por intermédio de flagelos peritricosos. A bactéria *B. velezensis* é capaz de crescer em concentrações de NaCl até 12% m/v. Seu crescimento ocorre dentro da faixa de temperatura de 15 a 45ºC e em valores de pH entre 5 e 10 e não crescem em anaerobiose na presença de nitrato ou fumarato, de indol, lisina descarboxilase, ornitina descarboxilase, urease, arginina di-hidrolase, triptofano-desaminase, fenilalanina-desaminase e em

lisozima (0.001%, m/v). *B. velezensis* é uma bactéria quimio-organotrófica e produtora das enzimas catalase e oxidase. Também produz ácidos a partir de L-arabinose, celobiose, D-frutose, glicerol, D-glucose, glicogênio, inositol, lactose, maltose, manitol, D-manose entre outros (RUIZ-GARCÍA et al., 2005). Apresenta a capacidade de reduzir nitrato e produzir sulfeto a partir da L-cisteína, hidrolisar sangue, amido, gelatina e caseína (RUIZ-GARCÍA et al., 2005).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Identificar e caracterizar os metabólitos secundários ativos secretados pela bactéria *Bacillus velezensis* que causam inibição no crescimento de fungos filamentosos fitopatogênicos.

3.2. Objetivos Específicos

1. Realizar a identificação filogenética da bactéria de estudo;
2. Realizar ensaios antagonísticos entre *B. velezensis* e o fungo filamentoso *Trichoderma reesei*;
3. Realizar ensaios antagonísticos entre *B. velezensis* e os fungos filamentosos fitopatogênicos *Fusarium graminearum, F. oxysporum, F. verticillioides, Aspergillus flavus, Bothrytis sp.* e *Moniliophthora perniciosa*;
4. Identificar os metabólitos secundários da bactéria por Espectrometria de Massas.
5. Realizar o fracionamento dos metabólitos por intermédio de separação em coluna de permeação em gel (SEPHADEX);
6. Realizar análises dos metabólitos isolados da coluna, por meio de UPLC-ESI-IT/MS;
7. Realizar ensaio de difusão em ágar com os grupos de frações obtidos através da técnica de cromatografia em permeação em gel contra os fungos filamentosos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos e Meios de Cultura

4.1.1. Micro-organismos

O micro-organismo utilizado para este trabalho foi a bactéria *Bacillus velezensis* isolada no Laboratório de Biotecnologia da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo, pelo Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde. A linhagem do fungo filamentoso *Trichoderma reesei* QM9414 cedida pelo Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde. Algumas espécies do fungo fitopatogênicos *Fusarium graminearum, F. oxysporum, F. verticillioides, Aspergillus flavus* e *Bothrytis sp.* foram fornecidos pelo Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda e Prof. Benedito Correia ambos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo ICB-USP. O fungo *Moniliophthora perniciosa* foi cedido pela Profª. Drª. Cristina Pungartnik do Departamento de Ciências Biológicas do Laboratório de Biotecnologia de fungos do Centro de Biotecnologia e Genética na Universidade Estadual de Santa Cruz em Ilhéus, Bahia.

4.1.2. Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados neste trabalho para o crescimento dos micro-organismos foram meio LB (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%) para o inóculo da bactéria e o mesmo acrescido de 2% de ágar para a obtenção do meio sólido; YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, ágar bacteriológico 2 %); PDA (ágar, dextrose de batata 3,9%) (MERCK). Para o ensaio referente ao melhor meio de cultura para produção dos metabólitos pela bactéria empregou-se os meios H medium (10g triptona, 8 g de NaCl), Lambda broth (10 g de triptona, 2,5 g de NaCl), LB medium (10 g triptona, 5g de extrato de levedura, 5g NaCl, 1 mL de NaOH 1 M), Tryptone broth (10 g de triptona, 5 g NaCl), TY medium 2x (16g triptona, 10g extrato de levedura, 5 g NaCl) e o caldo Batata Dextrose (BD). A preparação do caldo BD consiste em 200g de batata cozida em 700 ml de água deionizada, obtendo-se um caldo de batata o qual foi filtrado e transferido para um erlenmeyer de 2 L, o volume final foi ajustado para 1 L, adicionou-se 20g de dextrose e autoclavou-se a 121°C por 20 minutos).

4.2. Ensaios Antagonísticos *in vitro*

4.2.1 Ensaio Antagonísticos entre *B. velezensis* e o fungo *Trichoderma reesei*

Os ensaios com *T. reesei* QM9414 foram realizados utilizando-se uma suspensão estoque de esporos, a qual foi produzida a partir de uma suspensão anterior, da qual pipetou-se 3 µL em meio de

cultura PDA. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 7 dias e, após este período, os conídios contidos na placa foram resuspendidos em 10 mL de NaCl 0,9%, homogeneizados e quantificados em câmara de Neubauer, obtendo-se na contagem a média de 4 x10^8 conídios/ml.

Realizou-se a quantificação bacteriana através da leitura de OD_{600} em espectrofotômetro. Utilizou-se o meio de cultura LB onde a bactéria foi plaqueada e incubada a 37°C por 16 h e após inoculada em 5 mL de LB líquido. Uma alíquota da cultura teve absorbância medida em espectrofotômetro para determinação do número de células/mL da bactéria, o qual foi de 3,49 x 10^8células/mL.

Para o teste antagonístico de atividade antifúngica entre *B. velezensis* e o fungo *T. reesei* QM9414, utilizou-se o meio PDA. Em extremidades opostas de placas distintas de PDA foram pipetadas uma alíquota de 2 µL (8 x 10^5 conídios/ml), 4 µL (1,6 x 10^6 conídios/ml), 6 µL (2,4 x 10^6 conídios/ml), 8 µL (3,2 x 10^6 conídios/ml) e 10 µL (4 x 10^6 conídios/ml) dos conídios de *T. reesei* QM9414 (em placas distintas) e na outra extremidade, de cada placa, pipetou-se uma alíquota de 3 µL (1,047 x 10^6 cel/ml) de células bacteriana, enquanto na placa controle somente continha o fungo. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por um período de 7 dias.

4.2.3. Ensaio Antagonísticos entre *B. velezensis* e os fungos fitopatogênicos

Para o teste antagonístico entre *B. velezensis* e os fungos fitopatogênicos *Fusarium graminearum, F. oxysporum, F. verticillioides, A. flavus, M. perniciosa* e do fungo *Bothrytis* sp. utilizou-se 25 ml de meio de cultura PDA em cada placa de petri. Em uma mesma placa de PDA, foram pipetadas em suas extremidades uma alíquota 3 µL (1,047 x 10^6cel/ml) de células bacterianas e depositado um disco micelial (6 mm de diâmetro) com conídios crescidos por 7 dias no centro da placa. As placas controles somente continham os discos de 6 mm de conídios dos fungos. Todas as placas foram incubadas à temperatura ambiente por um período de 7 a 11 dias.

4.3. Obtenção dos Metabólitos Secundários de *B. velezensis*

4.3.1. Meio de cultura para produção de metabólitos secundários

Cerca de seis meios de cultura específicos para cultivo bacteriano foram escolhidos e testados para que entre eles fosse escolhido o meio mais adequado para produção dos metabólitos secundários de interesse deste estudo.

Os meios de cultura escolhidos foram meios ricos descritos no Short Protocols in Molecular Biology (1992), pois, a maioria dos trabalhos escolhiam meios deste tipo para este propósito. Os meios

de cultura escolhidos para este ensaio foram H medium, Lambda broth, LB medium, Tryptone broth, TY medium 2x e caldo Batata Dextrose (BD).

Cada meio de cultura foi inoculado com a bactéria e colocado sobre agitação a 140 rpm por 96 h a 30°C. Após estes meios foram centrifugados em centrífuga refrigerada HITACHI Himac CR21F a 8.000 rpm, com o rotor R10A durante 20 minutos à 4°C. Transferiu-se o sobrenadante de cada meio para erlenmeyers limpos, para que fossem filtrados a vácuo com filtro millipore de poros 0.22 µm para eliminar possível presença da bactéria no meio.

4.3.1.1. Obtenção das Frações Orgânicas

Para obtenção dos metabólitos secundários produzidos pela bactéria, submeteu-se 1 L do sobrenadante do meio de cultura a um processo de extração por partição. Empregou-se como solvente extrator 1 L de clorofórmio. A mistura foi agitada manualmente, em seguida, mantida em repouso até total separação entre as duas fases formadas sendo elas orgânica e aquosa. A fração orgânica passou por este procedimento por mais duas vezes, a fim de se obter uma maior quantidade dos metabólitos secundários. A fração orgânica foi transferida para um balão de fundo redondo para eliminação do solvente orgânico em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura de 45º C. Após a evaporação, obteve-se um líquido viscoso amarelado, denominado FrOrg. E em seguida, a FrOrg foi analisada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

4.3.1.2. Triagens Cromatográficas

As placas de CCD e Cromatografia em Camada Preparativa (CCP) (Merck Sílica gel G e GF254, sobre vidro) e cromatofolhas de alumínio de sílica gel Fluorescence UV 20 x 20 cm (CAT no. 4020222, Whatman) foram reveladas sob luz UV (254 e 365nm) e em seguida borrifadas com solução de anisaldeído sulfúrico modificado (Merck, 1971). Este último revelador é considerado universal por ter a capacidade de detectar diferentes classes de metabólitos secundários em diferentes colorações.

4.3.2. Produção dos metabólitos secundários por *B. velezensis*

Para extração dos metabólitos secundários, a bactéria *B. velezensis* foi plaqueada em meio LB acrescido de ágar e incubada a 37°C por 14 h. Após este período, com o auxílio de uma alça, retirou-se uma quantidade de células bacterianas para a inoculação em caldo BD, distribuído em 5 erlenmeyers (1L) contendo 200 mL do meio. Para aeração dos meios, estes foram mantidos sob agitação em shaker a 140 rpm com temperatura de 30°C por 96 h. Em seguida estes meios foram centrifugados em centrífuga refrigerada HITACHI Himac CR21F a 8.000 rpm, com o rotor R10A durante 20 minutos à 4°C. Transferiu-se o sobrenadante destes 5 frascos para um único erlenmeyer (1L) para então, ser efetuada a filtração a vácuo com filtros millipore de poros 0,22 µm para eliminar possível presença da bactéria no

meio. O meio foi mantido sob refrigeração a 4º C até o processo da extração dos metabólitos secundários presentes no mesmo.

4.4. Identificação Bacteriana

4.4.1. Extração do DNA

Utilizou-se para preparação e extração do DNA genômico da bactéria o protocolo CTAB modificado descrito por HAYNES (2012).

Inoculou-se a bactéria em 5 mL de LB, à 37° C por 12 h. Após este período, transferiu-se 1,5 mL do inóculo para um tubo de microcentrífuga, o qual foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min à temperatura ambiente; descartou-se o sobrenadante e o pellet foi resuspendido com Tampão TE (Tris 0,5 M; EDTA 10 mM). Ajustou-se a OD_{600} para 1 com tampão TE e transferiu-se cerca de 740 µl das células para um novo tubo de microcentrífuga e a este adicionou-se 20 µl de lisozima (100 mg/mL). À mistura, incorporou-se 40 µL de SDS 10% e 8 µL Proteinase K (10 mg/mL) e incubou-se por 1 hora a 56° C.

Posteriormente, adicionou-se 100 µL NaCl 5 M e 100 µL de CTAB/NaCl (10%/0,7M) e incubou-se a 65° C por 10 min. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), misturou-se, e então, centrifugou-se durante 10 min à temperatura ambiente. Coletou-se a fase aquosa que foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga. Adicionou-se 500 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v), misturou-se e centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 min à temperatura ambiente. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo de microcentrífuga e adicionou-se de 0,6 volumes de isopropanol a –20°C por 2 horas para precipitação do DNA.

Em seguida, a amostra foi centrifugada por 15 min em 12.000 rpm a 4°C, descartou-se o sobrenadante e ao pellet adicionou-se etanol 70% a -20°C, e a amostra novamente passou por centrifugação a 4°C em 12.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet deixado em temperatura ambiente para evaporação do etanol restante.

Ao pellet adicionou-se 170 µl de EB buffer do QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) e 1 µL de RNase A, centrifugou-se rapidamente (um pulso) e incubou-se por 1 hora a 37°C. Para a inativação da enzima RNase A; a amostra foi incubada posteriormente a 70°C por 15 min e o tubo em seguida foi levado ao gelo.

Para o processo de precipitação aplicou-se 0,1 volume de 3 M de acetato de sódio ao tubo com a amostra e ressuspendeu-se. Adicionou-se cerca de 2,5 volumes de etanol 100% e o tubo foi levado

novamente para ser centrifugado apenas com um pulso para misturar os reagentes à amostra. Em seguida, deixou-se a amostra a – 80°C por 30 min para precipitação do DNA e, após este período, centrifugou-se por 20 min em 10.000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e ao pellet novamente adicionou-se etanol 70% gelado e centrifugou-se a 4°C por 5 min a 10.000 rpm. Descartou-se o etanol e deixou-se o tubo aberto para evaporação do etanol restante. Por fim, ressuspendeu-se o pellet em 100 µl de Tampão TE e realizou-se uma eletroforese em gel de agarose de alíquota de 5 µl da amostra.

4.4.1.1. Eletroforese em gel de agarose

Preparou-se o gel de agarose 1% em tampão TBE (45 mMTris-Borato, 1mM EDTA pH 8.0) contendo 2,5 µl de corante de DNA SYBR SAFE (ThermoFisher Scientific). As corridas de eletroforese em tampão TBE ocorreram a 100 V por 40 min. Os fragmentos de DNA foram visualizados em transiluminador de luz azul Safe Imager Transluminator S37102 (Invitrogen Corporation).

4.4.2. PCR e Purificação

Para a amplificação do gene 16S rDNA do DNA genômico de *Bacillus velezensis*, utilizou-se primers específicos para esta região conservada do DNA. Utilizou-se o primer forward fD1 (5' - CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') e o primer reverse rD1 (5' – CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC – 3') descrito por WEISBURG e colaboradores (1991). Para a realização da PCR usou-se o aparelho Eppendorf® Mastercycler personal. A preparação da reação de PCR seguiu as recomendações indicadas pelo fabricante da enzima *Go Taq® DNA Polimerase* (Promega).

A reação de PCR em 50 µl foram nas seguintes condições: 30 ciclos consistindo de desnaturação à 95°C por 2 minutos, pareamento a 42°C por 30 segundos e elongação a 72°C por 1 minuto e 40 segundos. Por fim, um ciclo adicional de 5 minutos foi inserido para a extensão final e deixou-se a amostra a 4°C por tempo indeterminado. A visualização e separação das bandas do DNA foi feita em gel de agarose 1% usando voltagem de 100 V por 40 min e posterior visualização no MultiDoc-It M-16 (UVP).

Após eletroforese, purificou-se o DNA amplificado com *Qiaquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.4.3. Sequenciamento do DNA

Submeteu-se o produto purificado ao sequenciamento Sanger (Sanger 1977), com o auxílio do sequenciador automático ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems™) no Laboratório de Genômica e Elementos Transponíveis (GATe) (Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo).

Para isto preparou-se um mix de sequenciamento para a amostra de 16S rDNA cuja qual foi dividida em dois tubos. No tubo 1 colocou-se o mix que foi preparado utilizando-se de 3 µL de água MilliQ estéril, 2 µL de Buffer (5x), 2 µL de primer forward fD1 e 1 µL de BigDye (BigDye V3.1 Cycle - Thermo Fisher Scientific). Para o tubo 2, colocou-se o mesmo mix, porém, utilizou-se 2 µL do primer reverse rD1. As soluções foram submetidas ao seguinte ciclo de sequenciamento: 95°C por 90 s, seguido de 35 ciclos de 95°C por 18s, 55°C por 12 s e 60°C por 4min.

A precipitação dos produtos obtidos, foram realizadas adicionando-se aos mesmos 2 µL EDTA 125mM, 2 µL acetato de sódio 3 M e 50 µL de etanol 100% e homogenizou-se. Após homogenização incubou-se a temperatura ambiente por 15 min. Após este tempo centrifugou-se a amostra por 45 min a 4.000 rpm á 24°C e descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 70 µL de etanol 70% a amostra. Após a adição do etanol centrifugou-se a amostra por 15 min a 4.000 rpm á 24°C e seu sobrenadante foi novamente descartado e a amostra foi levada para estufa a 30°C até todo etanol evaporar, e em seguida ressuspendeu-se amostra em 10 µL formamida.

4.4.4. Qualidade das Sequências, Alinhamento Múltiplo e Análise Filogenética

Todas as sequências obtidas passaram por análise de qualidade por intermédio dos pacotes phred, phrap/cross_match/swat e consed/Autofinish (EWING & GREEN 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al. 1998; GORDON, 2001; GORDON, 2004) utilizando valores de qualidade iguais ou superiores a 20 (phred 20). Logo após a obtenção dos *contings* de alta qualidade, as sequências–consensos foram exportadas e checadas com o auxílio do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL et al. 1990).

Para o alinhamento múltiplo, obtiveram-se sequências do GenBank de diferentes espécies do gênero *Bacillus* (Anexo 1), as quais foram adicionadas as sequências originais produzidas neste estudo. As sequências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal Ω (SIEVERS, et al. 2011) com dois ciclos de múltiplas interações (10 e 100), cada uma com 20 processos paralelos independentes.

Realizou-se as análises filogenéticas usando o método de neighbor-joining (SAITOU & NEI 1980) com o programa MEGA 7 (KUMAR et al. 2015) e o modelo de evolução molecular K2P (KIMURA, 1980). Estimou-se o suporte dos ramos através de 1000 réplicas de *bootstrap* não-paramétrico (FELSENSTEIN, 1985) e utilizou-se os seguintes intervalos: suporte baixo de <50%, moderado > = 50% e < 75% e alto > 75% e <= 100%.

4.5. Análises Químicas

4.5.1. Obtenção da Fração Orgânica

Mediante o resultado do experimento realizado com os seis diferentes meios de cultura para o cultivo bacteriano, estabeleceu-se o caldo BD como sendo o que o melhor se adequou para a maior produção dos metabólitos secundários. Assim, submeteu-se 1 L de sobrenadante obtido no processo de extração por partição de acordo com o protocolo descrito no tópico 4.3.1.1. Após a eliminação do solvente orgânico em rotaevaporador sob pressão reduzida, obteve-se, um líquido viscoso de cor amarelada (0,0101 g; FrOrg), a qual foi analisada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para análise qualitativa da amostra.

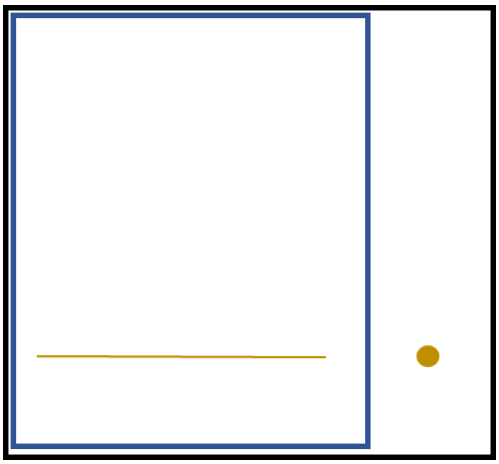
4.5.2. Triagens Cromatográficas

A triagem cromatográfica da fração orgânica bioativa obtida seguiu o protocolo descrito no tópico 4.3.1.2.

4.5.3. Purificação da Mistura de Metabólitos Antifúngicos

Várias misturas de solventes orgânicos foram testadas com fases móveis para o estabelecimento da melhor condição cromatográfica a ser utilizada para a separação dos metabólitos secundários presentes na FrOrg. Assim, a melhor separação entre os compostos foi empregando-se a fase móvel a partir da mistura de solvente hexano/acetato de etila nas proporções de 8:2 (v/v). Em seguida, aplicou-se a fração orgânica bioativa em uma placa cromatográfica em escala preparativa (CCP) através do uso de um capilar, reservando à direita desta placa como uma região guia, já que nem todas substâncias absorviam na região do ultravioleta. Em seguida, a placa foi eluída em uma cuba previamente saturada com a fase móvel selecionada. Utilizando-se uma placa de vidro transparente, recobriu-se a região à esquerda da placa preparativa, e em seguida esta foi aderida através do uso de fita adesiva, mantendo-se livre a região guia (Fig.2), a qual foi revelada em anisaldeído sulfúrico modificado e então, aquecida com um soprador térmico STV 1500 Vonder por 10 s. Através da revelação da região guia (região direita da placa), foi possível estimar o Rf de três metabólitos secundários na região esquerda desta mesma placa. Estes foram circundados e raspados com o auxílio de uma espátula e transferidos diretamente para erlenmeyer (50 mL), os quais foram extraídos utilizando-se como solvente clorofórmio. Para obtenção dos metabólitos isolados, as misturas foram filtradas e levadas à secura a 45º C, porém somente uma apresentou quantidade suficiente para análises posteriores (0,002 g, a qual corresponde ao (s) metabólito (s) majoritário (s) da fração).

Figura 2: Representação da placa de cromatografia em camada preparativa (CCP). Retângulo em preto com a amostra aplicada (linha e círculo em amarelo). Lado direito da placa preparativa, região com spot que serviu como fração guia para revelação em anisaldeído. Retângulo em azul, representação da placa de vidro aderida a região do isolamento para preservação dos metabólitos secundários.



4.5.4. ESI-MS^n análise

Realizou-se análise por injeção direta da amostra em um analisador ion-trap linear Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), tanto em modo positivo como negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Utilizou-se capilar metálico, fonte a 280° C, voltagem do spray de 5,00 kV, voltagem do capilar de - 35 V, tube lens -100 V e fluxo de 5,0 µL/min. Registrou-se a análise completa de varredura na faixa de 100-2000 *m/z*.

Fragmentações em vários estágios das moléculas (ESI-MS^n) foram realizadas usando o método CID (collision induced dissociation). Utilizou-se o gás hélio para a colisão contra os íons precursores. O primeiro evento foi um espectro de massa de varredura completa para adquirir dados sobre íons naquela faixa *m/z*. O segundo evento de varredura foi um experimento MS/MS realizado usando uma varredura dependente de dados nas moléculas ionizadas a partir das substâncias de *m/z*1059, 1045 e 1031 de interesse, em uma energia de colisão de 30% e um tempo de ativação de 30 ms. Os íons produto foram então submetidos a uma maior fragmentação nas mesmas condições, até que não foram observados mais fragmentos.

4.6. Análises e Fracionamento por permeação em gel

Para análise e fracionamento dos metabólitos secundários produzidos pela bactéria de estudo, fazia-se necessário uma considerável quantidade de massa de metabólitos para se dar continuidade no

estudo químico e biológico. Para isto, seguimos o protocolo descrito por BENITEZ et al. (2010) e PECCI et al. (2010) para obtenção de massa.

4.6.1. Precipitação Ácida.

Para obtenção de massa acidificou-se 6 L do sobrenadante (pH 6,5) obtido do cultivo bacteriano em caldo BD com ácido clorídrico 6 M, ajustando-se o pH até 2. A solução foi mantida a temperatura de 4° C por 24 h para precipitação. Após precipitação, o sobrenadante foi centrifugado a 8.000 rpm a 4°C por 20 min. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado por 4 x com água deionizada e seu pH foi novamente ajustado para 6,5 com adição de hidróxido de sódio 6 M. Assim, a mistura foi centrifugada, descartando-se o sobrenadante e o precipitado foi mantido a -20° C.

4.6.2. Fracionamento dos Metabólitos Oriundos do Precipitado

De acordo com o protocolo descrito por YE et al. (2012), cerca de 2,6 g do precipitado foi submetido a 2 extrações com 13 mL de metanol. Após a evaporação do solvente, o precipitado foi resuspendido em 12 mL de metanol. A solução foi transferida para uma coluna de permeação em gel (100 cm x 5 cm), Sephadex LH-20 (Pharmacia), a qual foi eluída em metanol (grau HPLC). Foram coletadas 63 frações de 5 mL cada (Sannomiya et al., 2005). Cerca de 6 µL de cada fração foi aplicada em CCD, utilizando-se como fase móvel a mistura de clorofórmio/metanol/água nas proporções de 80:18:2 (v/v), e em seguida as placas foram reveladas com anisaldeído sulfúrico modificado.

As frações que apresentaram os perfis cromatográficos semelhantes foram unidas em grupos de frações, as quais após a evaporação do solvente resultaram em FrSph1 (24 mg), FrSph 2 (13,9 mg), FrSph 3 (93 mg) e FrSph 4 (44,4 mg).

4.7. UPLC-ESI-IT-MS análise

Para as análises em UPLC-ESI-IT-MS, cada fração (2,0 mg) foi ressuspendida em 1 mL de MeOH grau HPLC e filtrado em cartucho Sep-Pack.

As análises em UPLC-ESI-IT-MS foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da Thermo Scientific, consistindo em um amostrador atômico Accela AS, uma bomba (Accela 600) quaternária acoplada com o espectro de massa LTQ XL descrito acima, operando nas mesmas condições. Foram injetadas alíquotas de 10 µL de cada amostra usando o amostrador automático. As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna apolar (Kinetex® core-shell, C_{18}, 1,7 µm, 100 x 2,1 mm, Phenomenex, EUA) à temperatura ambiente. As fases móveis consistiram no eluente A (0,01% de ácido fórmico em água, v / v) e o eluente B (0, 01% de ácido fórmico

em metanol, v/v). Estes eluentes foram injetados em um fluxo de 0,350 $mL.min^{-1}$ em gradiente linear: 50-100% B de 0 a 5,0 min. Após atingir 100% de B, esta condição foi mantida por 3 min.

4.8. Ensaio de Atividade Antifúngica com os grupos de Frações

O ensaio de difusão em ágar para teste da atividade antifúngica com as frações obtidas do fracionamento em coluna Sephadex foi realizado segundo o protocolo descrito por BENITEZ et al. (2010) e YE et al. (2012).

O experimento foi realizado em meio PDA (MERCK) e em duplicata, no qual discos de papéis (6mm de diâmetro) estéreis foram aplicados 2 cm a partir do centro da placa de petri. Alíquota de 10 µL ($1mg.mL^{-1}$) de cada fração a ser testada foi dissolvida em DMSO, e então aplicadas isoladamente em seus respectivos discos. Cada disco foi designado com sua fração correspondente, sendo elas: 1 (FrSph 1), 2 (FrSph 2), 3 (FrSph 3), 4 (FrSph 4) e C para o controle em DMSO. Pipetou-se no centro da placa de petri 10^4 conídios/mL dos fungos usados neste estudo. Em seguida foi realizada a incubação das placas, as quais foram mantidas a 25°C ± 2 por 4 dias até que o crescimento micelial cobrisse o disco C (DMSO). Apenas o fungo *M. perniciosa* demorou 10 dias para atingir o padrão descrito no protocolo, pois, seu crescimento é lento.

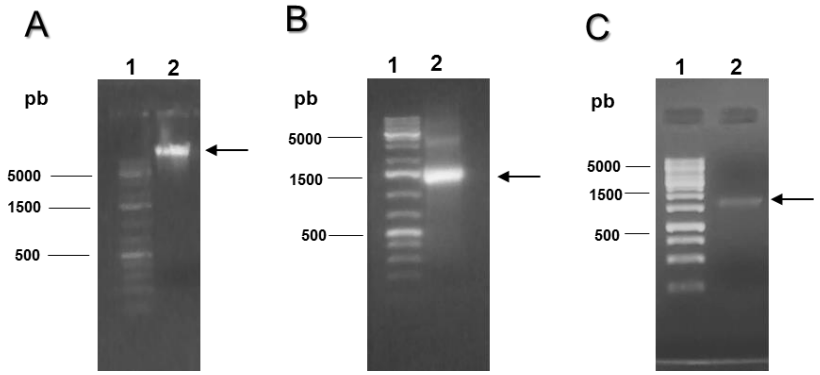
5. RESULTADOS

5.1. Identificação Bacteriana

5.1.1 Extração do DNA Genômico, PCR e Purificação

Para a confirmação da extração do DNA genômico da bactéria realizou-se uma eletroforese em gel de agarose (Fig. 3A). Após a extração do DNA a região 16S rDNA foi amplificada por PCR, obtendo-se uma banda de, aproximadamente, 1500 pb como produto da amplificação (Fig. 3B). O produto da amplificação passou por um processo de purificação para posterior sequenciamento de DNA e sua presença foi confirmada em gel de agarose, aplicando-se 2µL do produto purificado (Fig. 3C).

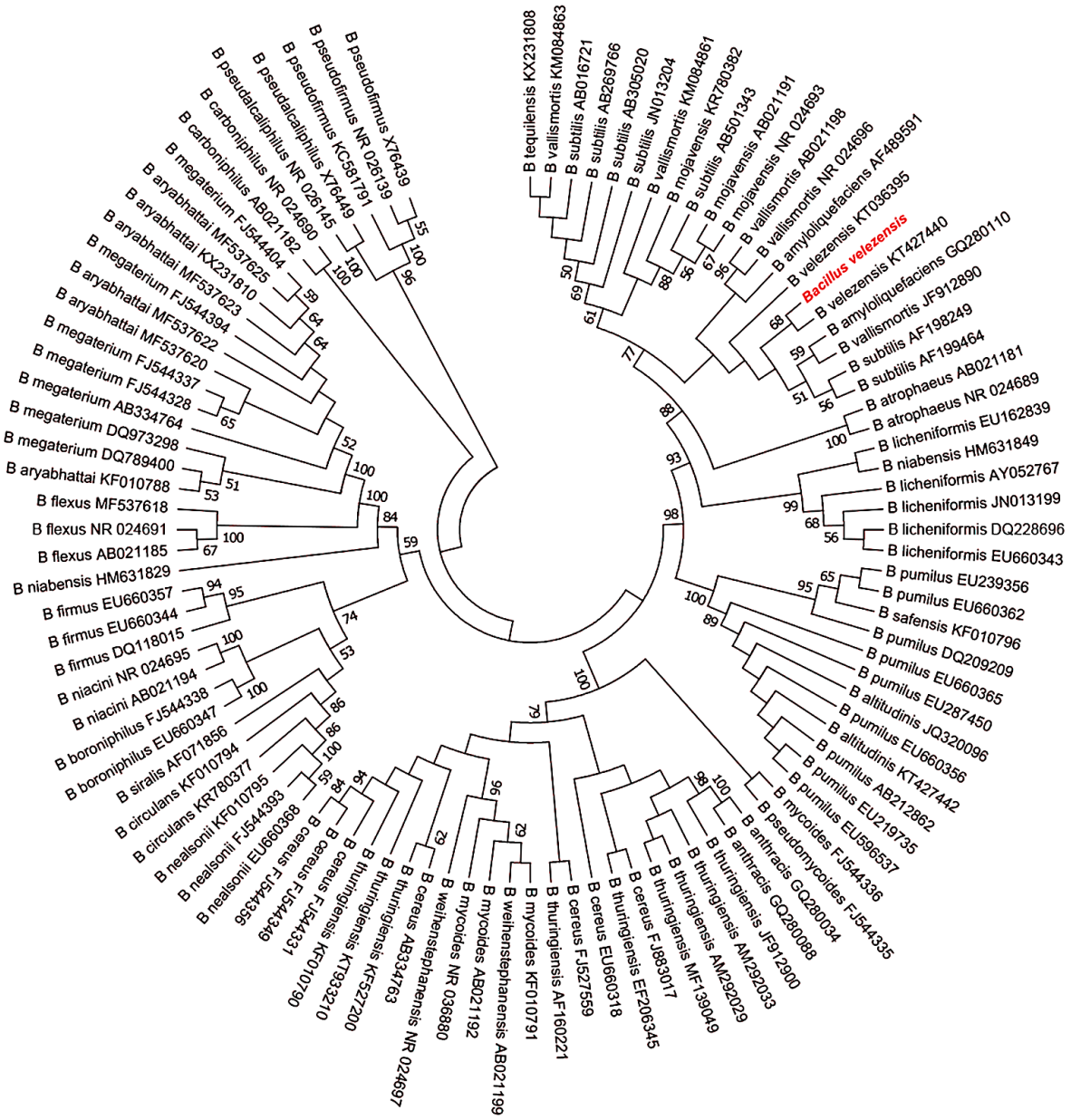
Figura 3: Confirmação da extração do DNA genômico e amplificação do gene 16S rDNA por eletroforese. 1. Padrão de peso molecular 1 kb DNA Ladder Plus (ThermoFisher); 2. Amostras do DNA da bactéria. A) DNA genômico obtido através do protocolo CTAB modificado (seta, canaleta 2). B) Produto da amplificação da região 16S rDNA (seta à direita indica o produto de PCR na canaleta 2). C). Produto da amplificação da região 16S rDNA purificado (seta, canaleta 2).



5.1.2. Árvore Filogenética e Identificação Molecular

A reconstrução filogenética com base na sequência do gene 16S rDNA da bactéria, indicou que a mesma provavelmente seja *Bacillus velezensis* (Fig. 4) dado o nível de suporte (moderado).

Figura 4: Árvore filogenética da bactéria *B. velezensis* (em vermelho) baseada na sequência 16S rDNA. A história evolutiva foi inferida utilizando-se do método neighbor-joining com 1000 réplicas de bootstrap não-paramétrico, utilizando o modelo de Kimura 2-p (K2P)



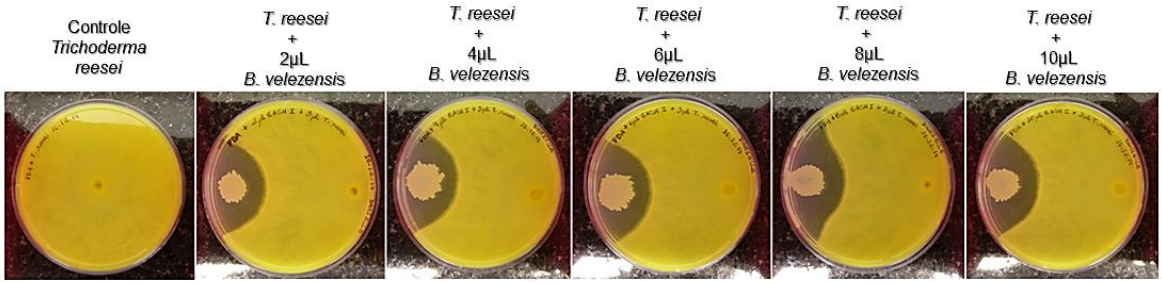
5.2. Teste Antagonístico

5.2.1. Efeito antagonístico de *B. velezensis* contra *Trichoderma reesei* QM9414

O fungo filamentoso *T. reesei* QM9414 foi escolhido para este ensaio, pois *B. velezensis* foi encontrada fortuitamente em uma placa apresentando a inibição contra *T. reesei* QM9414. Esta foi isolada pelo Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde. Assim, para avaliação da atividade

antifúngica da bactéria *B. velezensis* frente aos conídios do fungo filamentoso *T. reesei* QM9414, semeou-se ambos em mesma placa em concentrações seriadas 2, 4, 6, 8 e 10 µL. Comparando-se o crescimento do fungo da placa controle com aquelas contendo as diferentes concentrações da bactéria, é possível constatar que o composto secretado pela bactéria tem efeito inibitório contra o fungo filamentoso (Fig. 5), e que as diferenças nas concentrações não influenciaram no tamanho do halo formado.

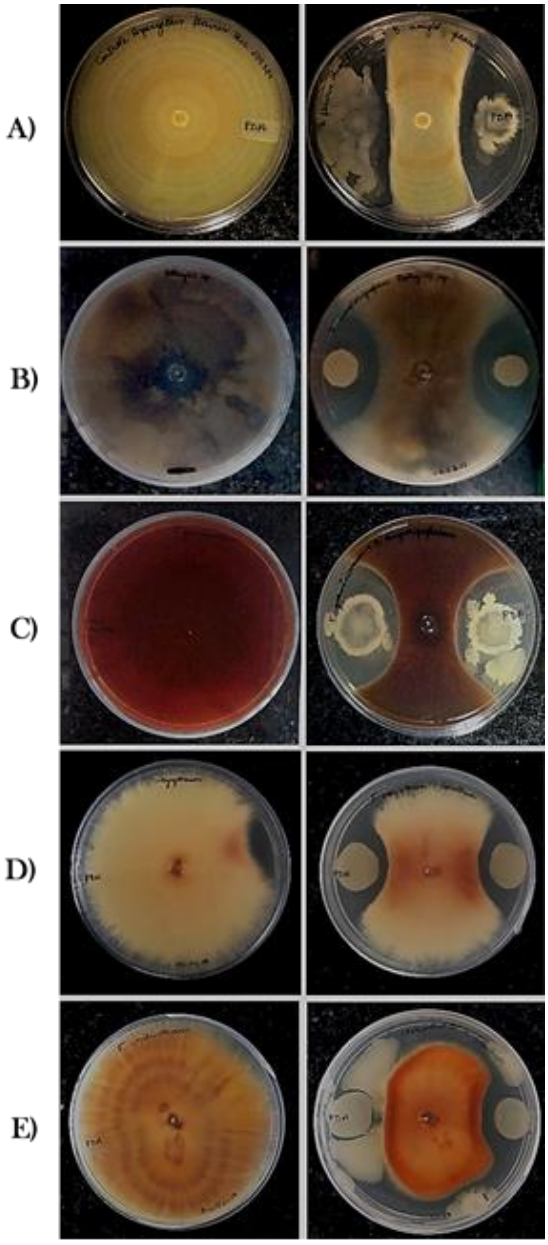
Figura 5. Ensaio antagonístico entre *B. velezensis* e *T. reesei* QM9414. Cultura saturada da bactéria aplicada nos volumes indicados e, cultura do fungo alíquotado de 3µL sobre placas PDA, que foram incubadas por 7 dias, em temperatura ambiente.



5.2.3. Efeito antagonístico de *B. velezensis* contra fungos filamentosos fitopatogênicos

Para avaliação da atividade antifúngica de *B. velezensis* frente aos *fungos* filamentosos fitopatogênicos *A. flavus*, *Botrytis sp.*; *F. graminearum; F. oxysporum*; *F. verticillioides* e *M. perniciosa* semeou-se os fungos com a bactéria em placas distintas, e comparou-se o crescimento dos fungos das placas controles com o crescimento dos fungos na presença da bactéria. Foi possível constatar que o (s) composto (s) secretado (s) pela bactéria tem (têm) efeito inibitório contra todos os fungos fitopatogênicos testados (Fig.6).

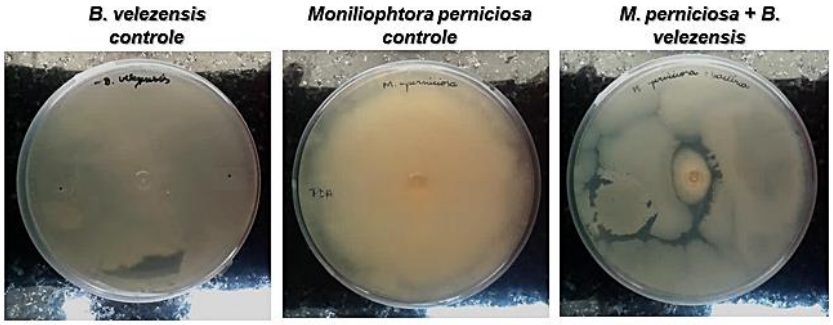
Figura 6. Ensaio de atividade antagonistíca entre *B. velezensis* e os fungos fitopatogênicos (A) *Aspergillus flavus* ATCC:204304, (B) *Bothrytis* sp., (C) *Fusarium graminearum*, (D) *F. oxysporum*, (E) *F. verticillioides*. Aliquotou-se 3 µL da cultura saturada da bactéria e aplicou-se em placas PDA (coluna direita) e adicionou-se ao centro da placa um disco de 6 mm com esporo dos fungos. Como controle aplicou-se um disco de 6 mm de conídios do fungo sobre a placa (coluna esquerda). As placas foram encubadas por 7 dias em temperatura ambiente.



Para o fungo *M. perniciosa* realizou-se o mesmo ensaio antagonístico preparado para os fungos fitopatogênicos anteriormente descritos. Semeou-se o fungo em uma placa com meio de cultura PDA na presença da bactéria e em uma placa controle (PDA), e observou-se o crescimento. Posteriormente ao período de crescimento constatou-se que o (s) composto (s) secretado(s) pela bactéria ocasiona (m) inibição no crescimento deste fungo (Fig.7).

Figura 7. Ensaio de atividade antagonistíca entre *B. velezensis* e *M. perniciosa*. Adicionou-se ao centro da placa um disco de 6 mm com esporo do fungo. Como controle positivo aliquotou-se 3 µL da cultura saturada da bactéria e aplicou-se em placa

PDA, e como controle negativo, um disco de 6 mm de conídios do fungo. As placas foram incubadas por 11 dias em temperatura ambiente.



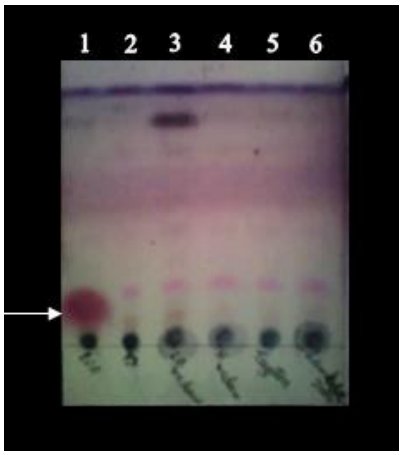
5.3. Análises Químicas

5.3.1. Seleção do meio de cultura para Produção de Metabólitos Secundários pela bactéria

O cultivo da bactéria *B. velezensis* foi testado em diferentes meios de cultura, sendo eles TY medium 2x; LB medium; H medium, Lambda broth, Tryptone broth e caldo BD. Após o processo de extração e triagem cromatográfica por CCD, observou-se que em caldo BD, houve uma maior produção de metabólitos secundários pela bactéria do que nos demais meios. Como é possível visualizar na indicação da seta da na Fig.8.

Figura 8. Análise cromatográfica por CCD dos extratos obtidos dos diferentes meios de culturas testados para produção dos metabólitos secundários pela bactéria *B. velezensis*. 1) Metabólitos Secundários obtidos em caldo BD; 2) Metabólitos Secundários obtidos em TY medium 2x; 3) Metabólitos Secundários obtidos em LB medium; 4) Metabólitos Secundários obtidos em H medium; 5) Metabólitos Secundários obtidos em Tryptone broth; 6) Metabólitos Secundários obtidos em Lambda broth.

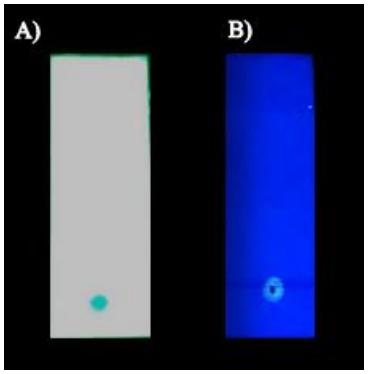
Placa sílica gel, fase móvel: hexano/acetato 8:2 (v/v) e revelador anisaldeído sulfúrico modificado



5.3.2. Obtenção da fração antifúngica

O sobrenadante, obtido da fermentação da bactéria em meio BD, foi submetido à consecutivas extrações por partição utilizando clorofórmio como solvente. A mistura foi separada em funil de separação, obtendo-se assim a fração orgânica (FrOrg). Para eliminação do solvente orgânico foi utilizado um sistema de rotaevaporação sob pressão reduzida. Após testar várias fases móveis das diferentes misturas de solventes como hexano/acetato de etila, clorofórmio/metanol e clorofórmio/metanol/água em diferentes proporções, a melhor resolução para separação dos metabólitos ali presentes, foi utilizando-se a mistura de hexano/acetato de etila 8:2 (v/v). A revelação da placa de CCD sob luz ultravioleta no comprimento de onda 365 nm mostrou que existência de um ou mais compostos de Rf igual 0,18 com coloração amarelo brilhante (Fig. 9). Este (s) composto (s) absorvem também em 254 nm.

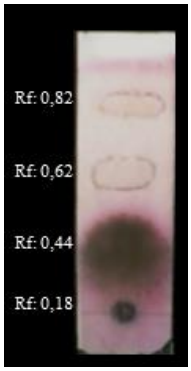
Figura 9. Análise por CCD e revelação por luz ultravioleta nos comprimentos de ondas de 254 e 365 nm. Placa (A) revelação da placa CCD em 254 nm; Placa (B) Revelação da placa em 365 nm



Ao utilizar como revelador a solução de anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento, observou-se a revelação de 2 metabólitos de colorações rosada com Rf de 0,18 e 0,44 e dois outros “spots” amarelados com Rfs 0,62 e 0,82 (Fig. 10), os quais não eram reveláveis sob luz ultravioleta a 254 e 365 nm (Fig. 9). Através desta análise por CCD é possível observar que o composto com Rf 0,44, é o majoritário nesta fração.

Figura 10. Análise por CCDC da fração do extrato contendo o princípio bioativos. “Spots” de metabólitos presentes na fração com os seus respectivos Rfs indicados.FM: hexano/acetato de etila 8:2 (v/v) e revelação em anisaldeído sulfúrico.

Placa sílica gel, fase móvel: hexano/acetato 8:2 (v/v) e revelador anisaldeído sulfúrico modificado

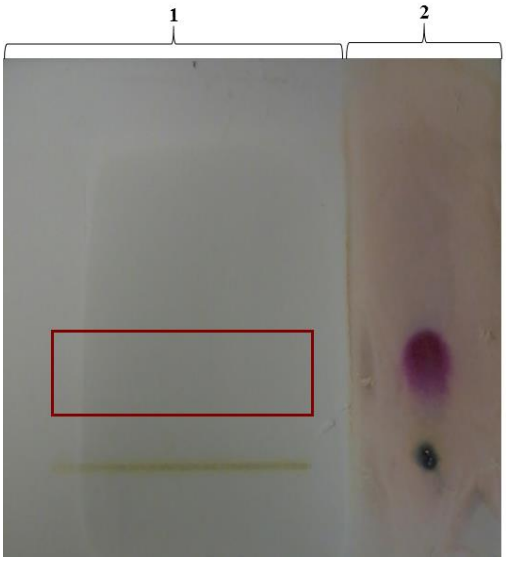


5.3.3. Purificação dos compostos presentes na fração orgânica bioativa (FrOrg)

Para a purificação dos compostos presentes na FrOrg de *B. velezensis*, a fração foi diluída em 7 mL de clorofórmio, e aplicada em uma placa de sílica gel em escala preparativa CCDP. Após eluição cromatográfica e recobrimento parcial da porção 1 da placa, e revelação em anisaldeído sulfúrico (Fig. 11), foi possível a visualização de um largo “spot” rosado na região guia, permitindo assim delimitar esta mesma substância a porção 1 desta placa. Obtendo-se desta forma o (s) composto (s) isolado (s).

Figura 11. Placa cromatográfica em escala preparativa para purificação da FrOrg. (1) Região a ser isolada da mistura. Retângulo em rosa representa a região que foi raspada da placa. Fase móvel utilizada Hexano/Acetato 8:2. (2) Região guia revelada com anisaldeído contendo o composto majoritário.

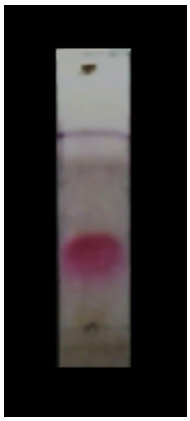
Placa sílica gel, fase móvel: hexano/acetato 8:2 (v/v) e revelador anisaldeído sulfúrico modificado



Para averiguação da efetividade da separação e/ou da pureza do composto isolado, realizou-se uma nova CCD nas mesmas condições cromatográfica previamente estabelecidas (Fig. 12).

Figura 12. CCD referente ao purificado da FrOrg de *B. velezensis*. Fase móvel: Hexano/acetato 8:2 (v/v), revelação em anisaldeído sulfúrico.

Placa sílica gel, fase móvel: hexano/acetato 8:2 (v/v) e revelador anisaldeído sulfúrico modificado

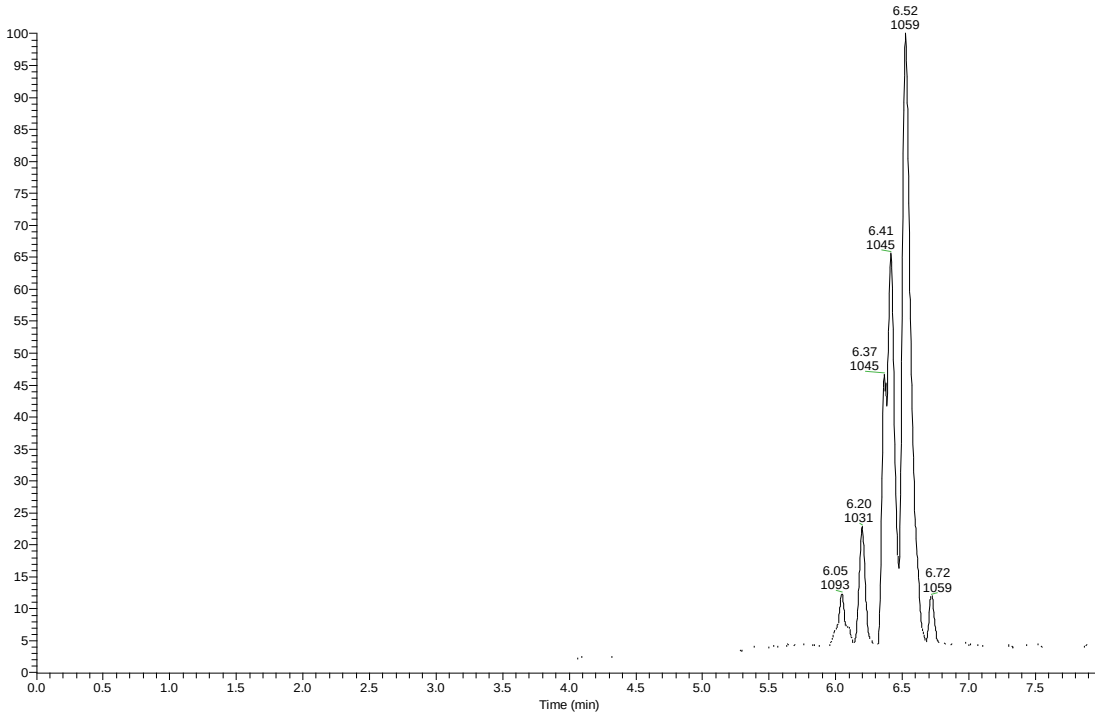


5.4. Análise por UPLC-MS e ESI-CID/MS^n

5.4.1. Perfil cromatográfico por UPLC-MS da FrOrg

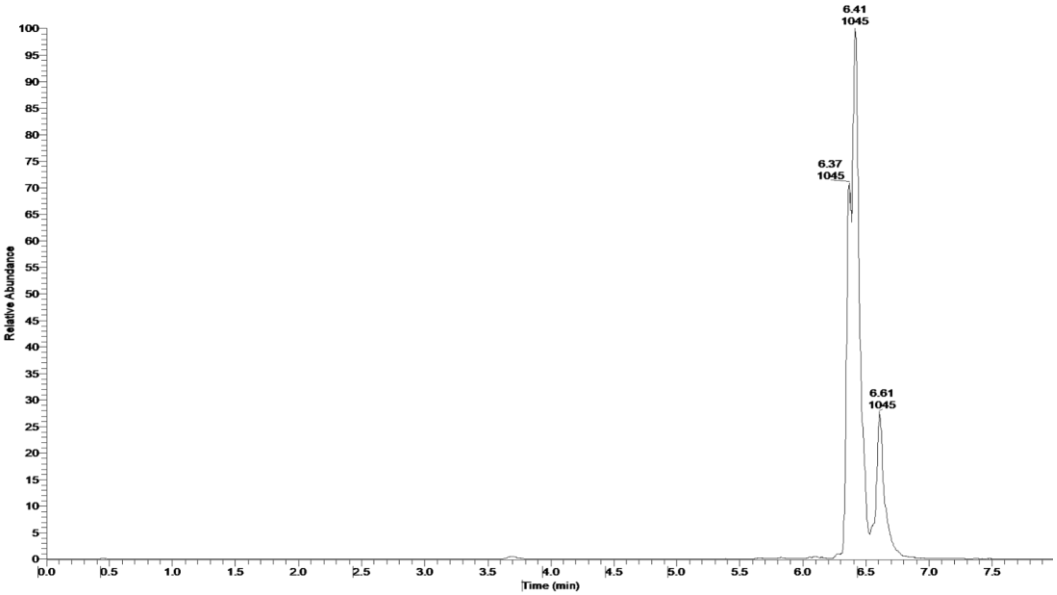
A análise por UPLC-ESI-IT-MS da FrOrg de *B. velezensis* indicou a presença de pelo menos, 6 picos nesta mistura (Fig.13).

Figura 13. Cromatograma obtido por UPLC-MS da fração orgânica bioativa de *B. velezensis*.



O cromatograma do íon extraído de *m/z* 1045, indicou a presença de mais de uma molécula com esta mesma massa carga (Fig. 14).

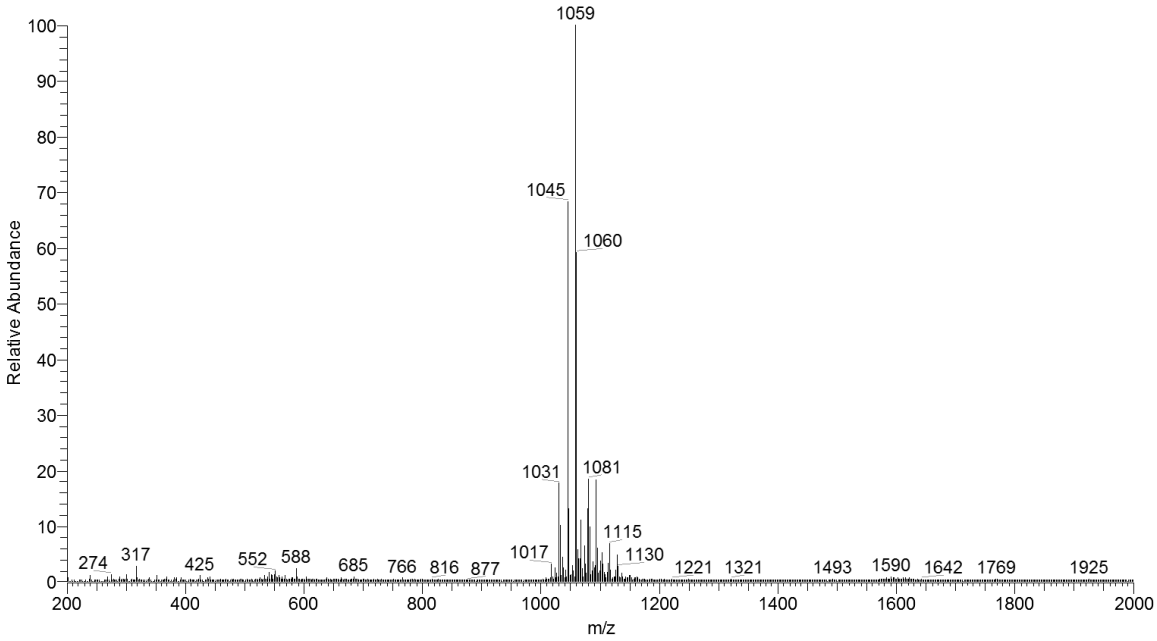
Figura 14. Cromatograma obtido por UPLC-MS do íon de *m/z*1045.



5.4.2. Full scan ESI-CID/MS da FrOrg

A análise por injeção direta de espectrometria de massas (ESI-CID/MS) da FrOrg mostrou um grupo de picos, dos quais os mais proeminentes foram os de *m/z* 1031, 1045, 1059, 1060 e 1081 (Fig. 15), dentre estes, apenas os picos de *m/z* 1031, 1045 e 1059, foram estudados. Estes picos foram selecionados para realização dos experimentos de ESI-MS^n.

Figura 15. Full scan ESI-MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas da fração clorofórmica dos metabólitos de *B. velezensis*.



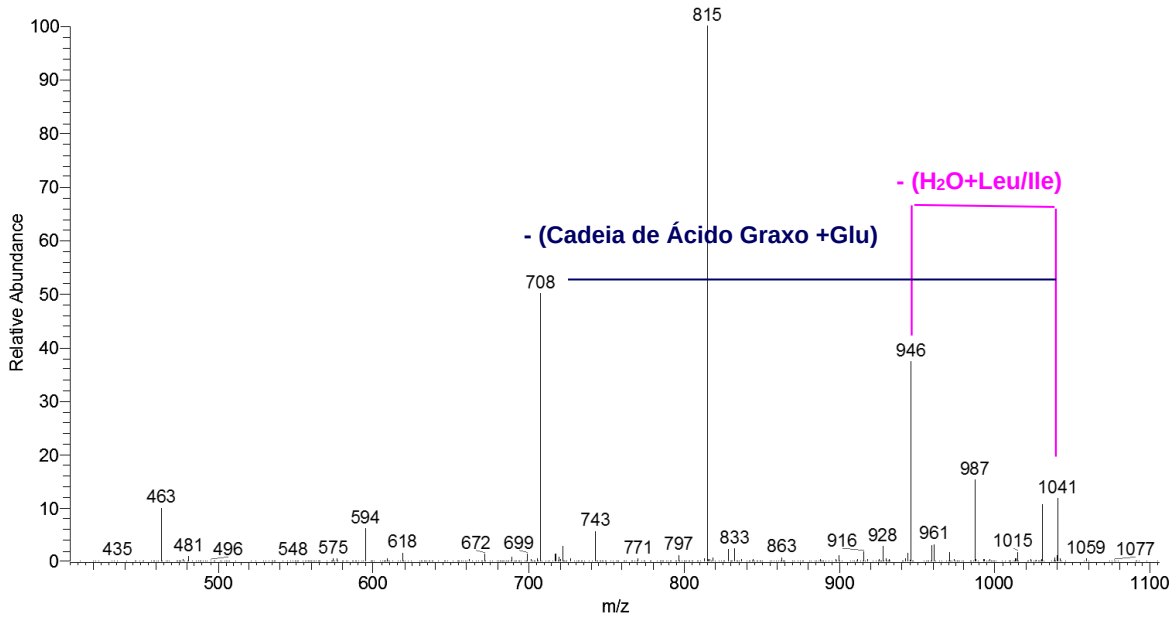
Vários experimentos de MS^n para cada um destes picos foram adquiridos para que estes

auxiliassem na determinação estrutural dos metabólitos secundários presentes na fração orgânica.

5.4.2.1. Íon $[M+Na]^+$ *m/z* 1059

O experimento de MS^2 a partir do íon de *m/z* 1059 gerou vários fragmentos, dentre eles o de *m/z* 1041 que equivale a perda de uma molécula de H_2O. O íon *m/z* 946, indicando perda de 113 Da, cujo fragmento corresponde a uma leucina/isoleucina. O fragmento de *m/z* de 708 refere-se à perda 351 Da, o qual corresponde à perda da cadeia do ácido graxo contendo quinze carbonos (C_{15}) associada uma unidade de glutamato (Fig. 16).

Figura 16. Experimento MS^2 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) espectro de massas do íon *m/z* 1059. E a clivagem mostrando a perda de uma leucina e cadeia de ácido graxo C_{15}.



A partir do íon produto de *m/z* 946 realizou-se um novo experimento, o qual promoveu a formação do fragmento de *m/z* 833, indicando novamente a perda 113 Da de uma outra leucina da estrutura da molécula (Fig. 17). Esta fragmentação gerou também o íon produto de *m/z* 815 e o íon produto *m/z* 718, os quais correspondem respectivamente a perda de uma molécula H_2O e de um ácido aspártico (115 Da) (Fig. 18).

Figura 17. Experimento MS^3 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon de *m/z* 946. E a clivagem mostrando a perda de uma leucina.

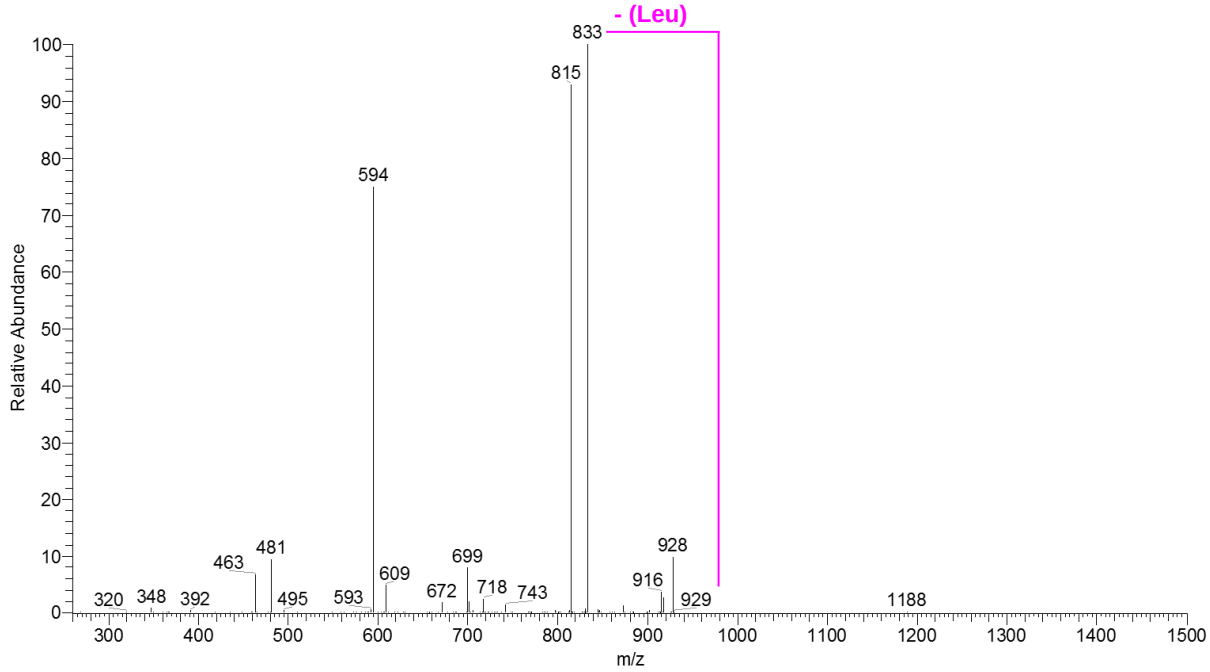
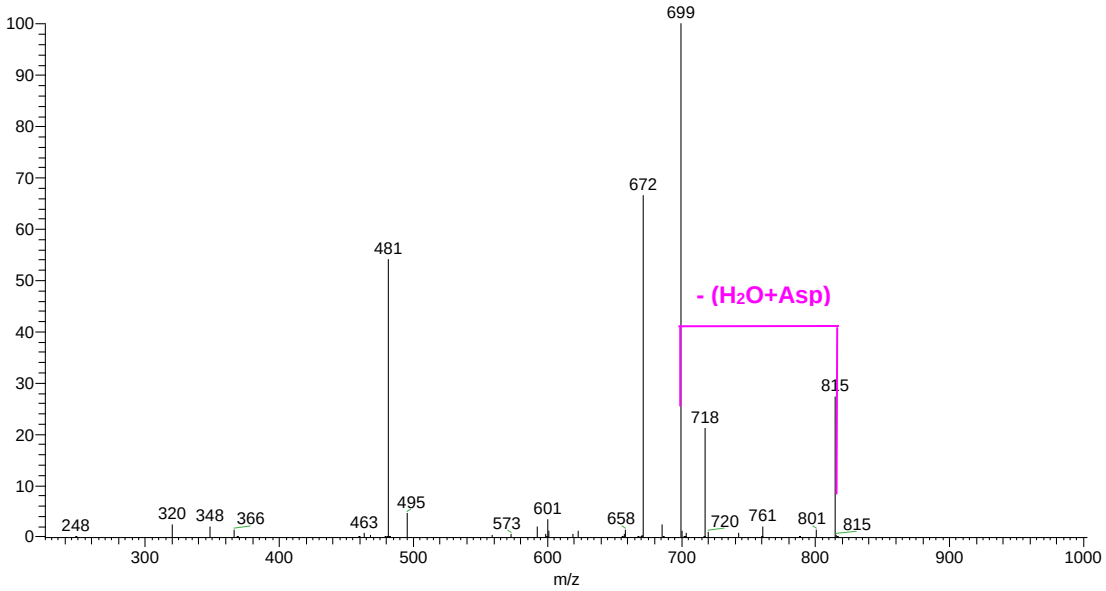
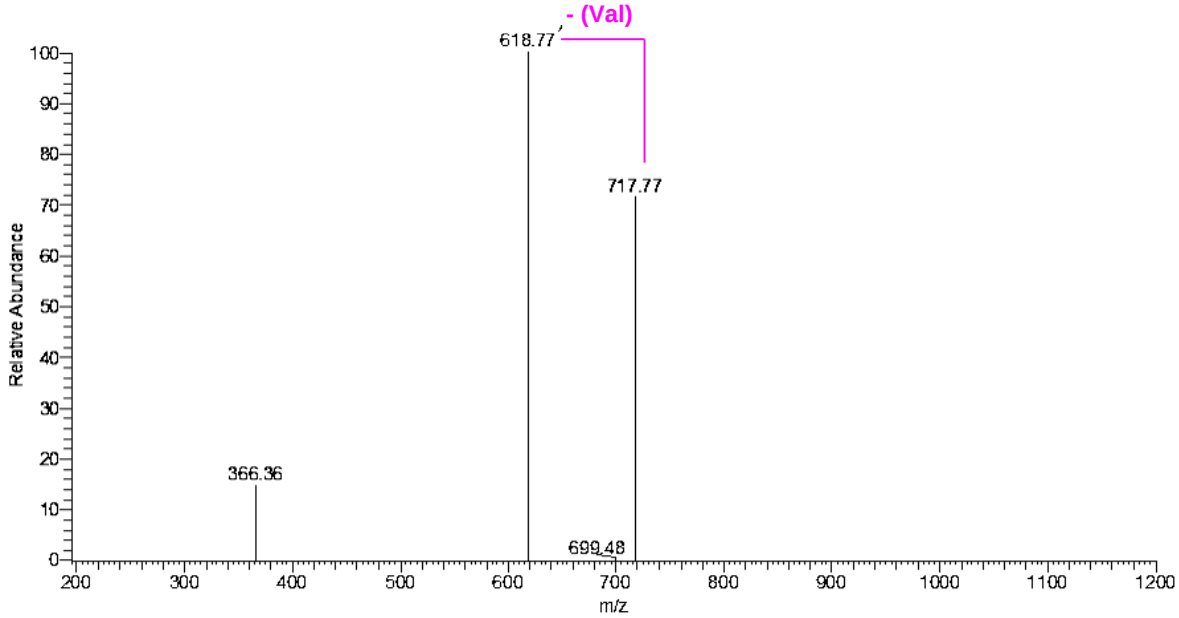


Figura 18. Experimento MS^4 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon de *m/z* 833. E a clivagem mostrando a perda de um aspartato e uma molécula de H_2O.



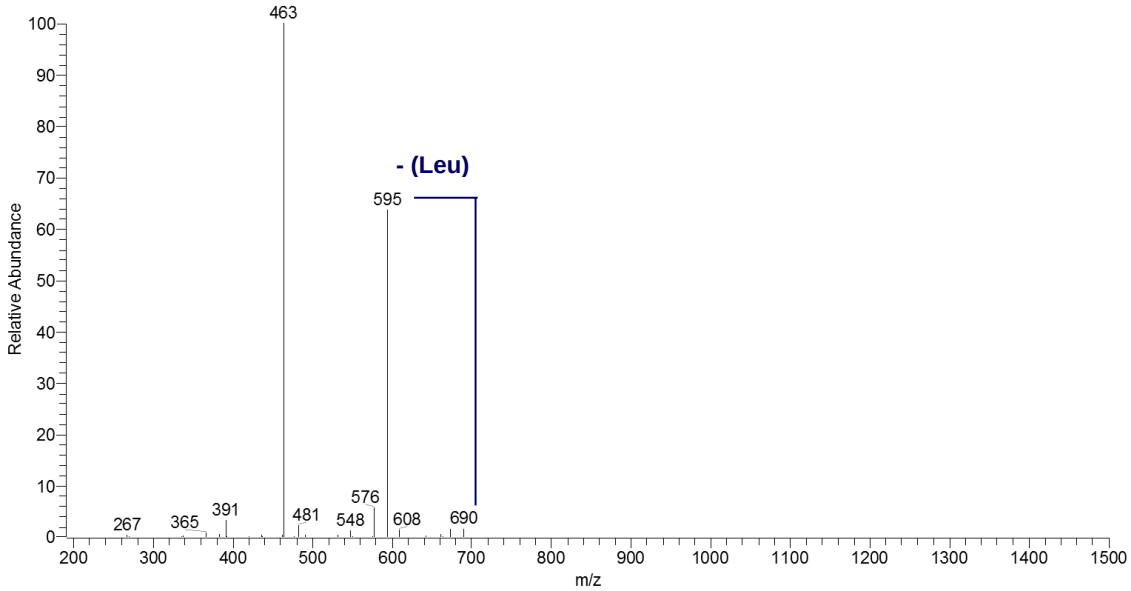
Realizou-se o MS^4 do íon produto de *m/z* 718, o qual gerou o íon produto de *m/z* 618, indicando a presença de uma valina na estrutura da molécula, através da perda de 99 Da (Fig. 19).

Figura 19. Experimento MS^5 realizado por ESI-CID/MS ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 717 gerando o pico 618 equivalendo à perda de uma valina.



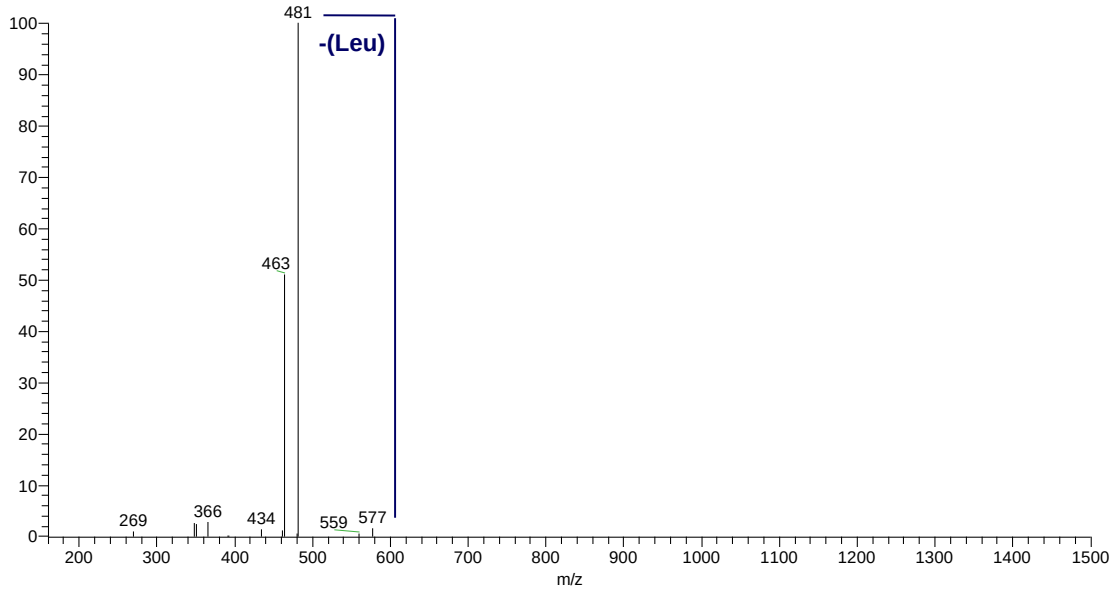
O MS a partir do íon *m/z* 708, mostrou a formação do íon produto de *m/z* 595, o qual corresponde a perda de 113 Da, e, portanto, a perda de uma outra unidade de leucina (Fig. 20).

Figura 20. Experimento MS^3 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon 708 gerando o íon de *m/z* 595 equivalendo à perda de uma leucina.



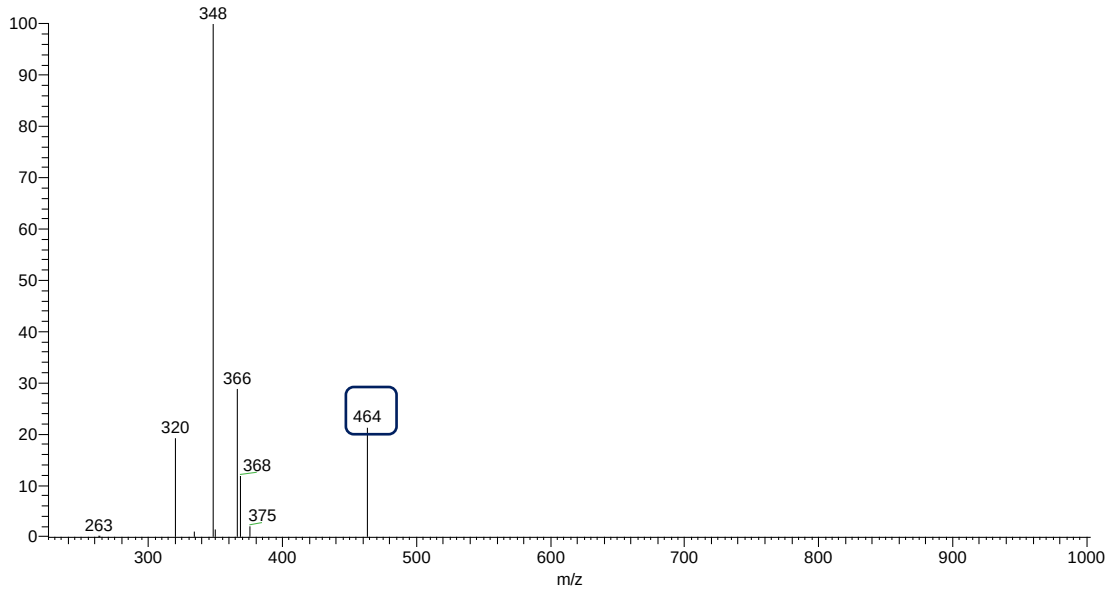
Realizou-se o MS^4 do íon produto de *m/z* 595, o qual gerou o íon produto de *m/z* 481, indicando a presença de uma valina na estrutura da molécula, através da perda de 99 Da (Fig. 21).

Figura 21. Experimento MS^4 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo do espectro de massas do íon produto de *m/z* 595 gerando o pico 481.



A perda de uma molécula de água a partir do íon *m/z* 481 é observada através do experimento de MS^5 (Fig. 22) formando o íon produto de *m/z* 464.

Figura 22. Experimento MS^5 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon produto de *m/z* 481 gerando o íon produto de *m/z* 464.



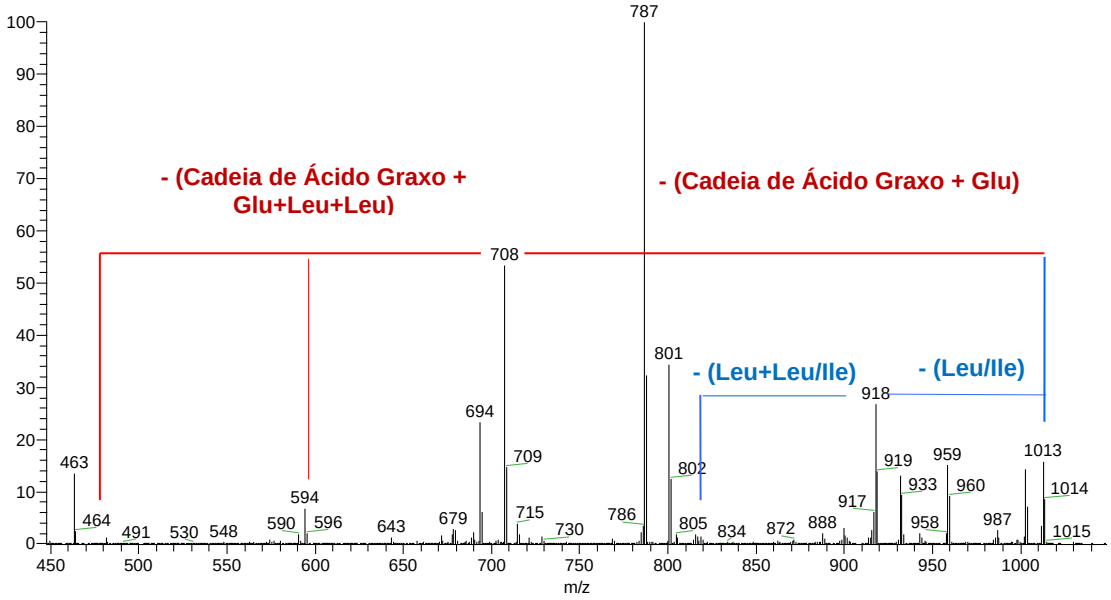
Estes dados permitem sugerir que a molécula se refere ao heptapeptídeo surfactina (Tabela 1).

5.4.2.2. Íon $[M+Na]^+$ *m/z* 1031

Alguns experimentos foram realizados para a determinação estrutural da molécula de *m/z* 1031, de modo análogo àqueles descritos anteriormente para a molécula de *m/z* 1059.

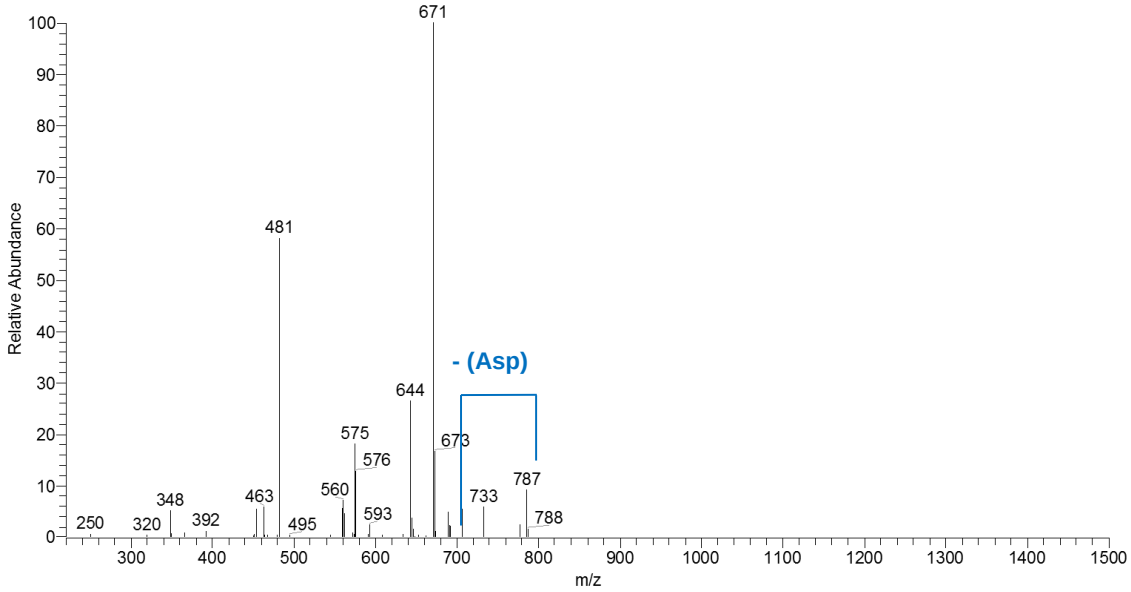
O experimento de MS^2 a partir do íon de *m/z* 1031 (Fig. 23), gerou vários fragmentos, dentre eles o de *m/z* 1013, o qual refere-se à perda de uma molécula de H_2O. O íon de *m/z* 918, indica a perda de 113 Da, cujo fragmento corresponde à uma leucina/isoleucina. A partir do íon produto de *m/z* 918, observou-se também os fragmentos de *m/z* 805 e 787, o qual indicam a perda 113 Da de uma outra leucina, e de uma molécula de H_2O, respectivamente (Fig. 23). O fragmento de *m/z* de 708 refere-se à perda 351 Da, o qual corresponde à perda da cadeia do ácido graxo (C_{13}) associada a uma unidade de glutamato. Os íons de *m/z* 594 e 464 correspondem às perdas de duas leucinas consecutivas e uma molécula de água, as quais pertencem à cadeia lateral de ácido graxo (Fig. 23).

Figura 23. Full MS^2 ESI-CID/MS, ionização em modo ionização em modo positivo (35 eV) do íon produto de *m/z* 1031. As marcações em azul correspondem a perda de duas.



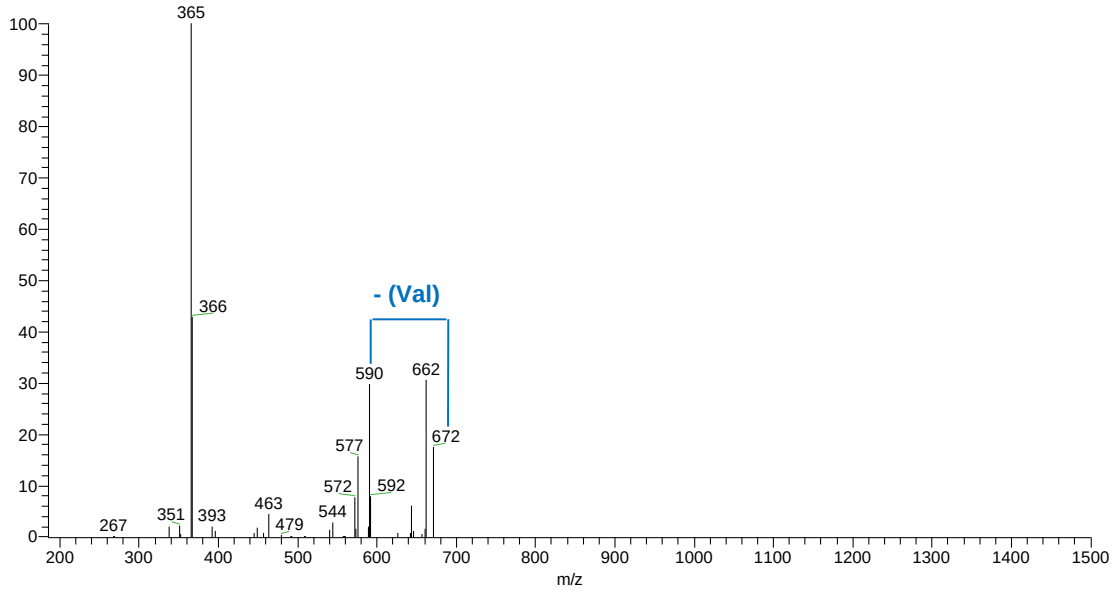
O experimento de MS^3 a partir do íon de *m/z* 787, observou-se a formação do íon-produto de *m/z* 689, indicando a perda de 115 Da, a qual equivale a uma unidade de ácido aspártico (Fig. 24).

Figura 24. Experimento MS^3 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon produto de *m/z* 918 gerando o íon produto de *m/z* 805 (787) a partir do íon *m/z* 787 a geração do íon de *m/z* 689



O MS^3 a partir do íon *m/z* 689, mostrou a formação dos íons produtos de *m/z* 672 e de *m/z* 590, os quais correspondem as perdas de uma molécula de H_2O e de uma valina, respectivamente (Fig. 25).

Figura 25. Experimento MS^3 realizado por ESI-CID/MS ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon produto de *m/z* 689 (672) gerando o íon produto de *m/z* 590.



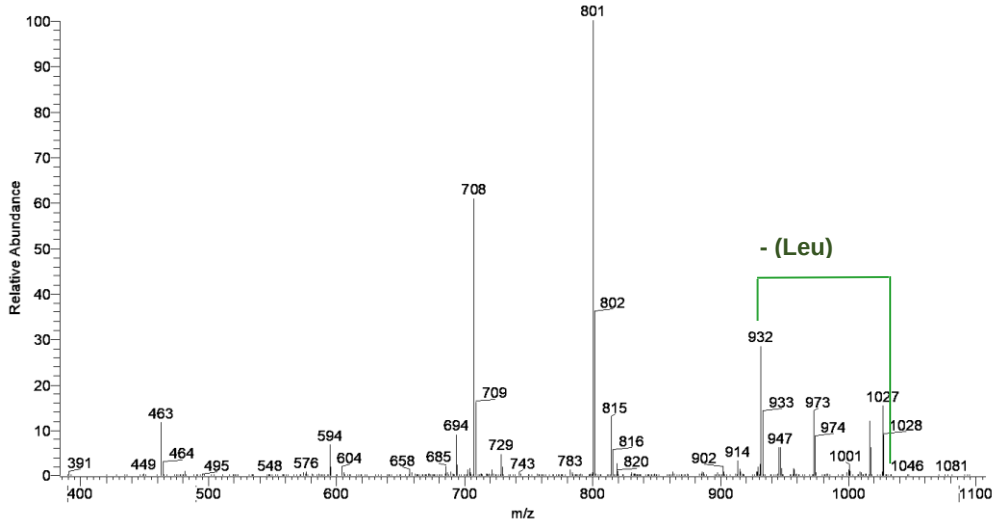
Estes dados permitem sugerir que a molécula se refere ao heptapeptídio surfactina (Tabela 1).

5.4.2.3. Íon $[M+Na]^+$ *m/z* 1045

As análises para o íon de *m/z* 1045 foram realizadas de modo análogo aos outros íons

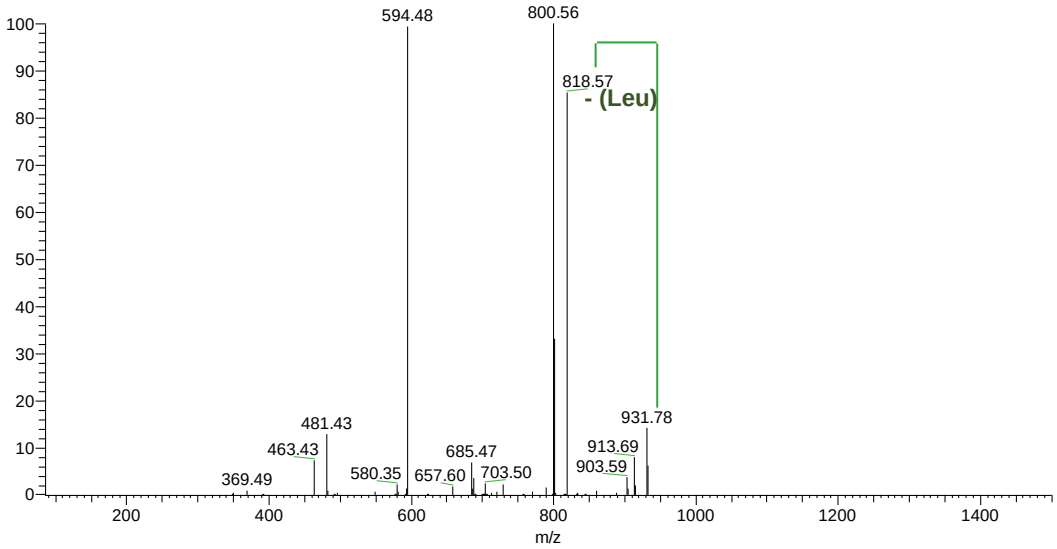
anteriormente descritos. Este íon passou por clivagem e seus fragmentos foram analisados (Fig.26). Um dos produtos da fragmentação do íon 1045 foi o íon produto de *m/z* 932, o qual refere-se à perda de uma leucina/isoleucina (113 Da) (Fig.26).

Figura 26. Full MS^2 ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 1045.



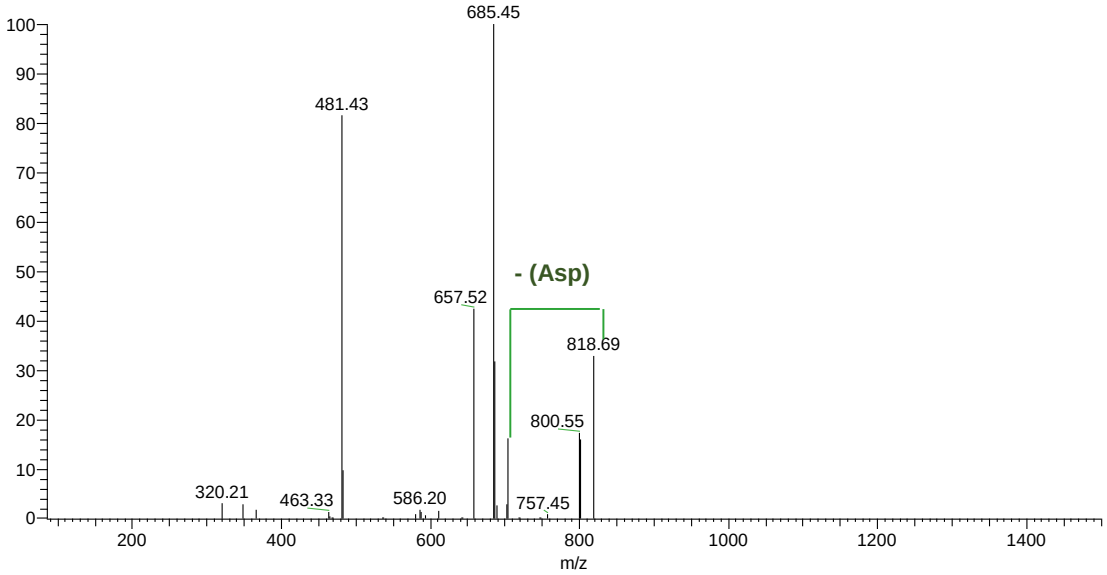
O MS^3 do íon de *m/z* 932 gerou o íon produto de *m/z* 818 e este corresponde à perda de 113 Da, cujo o fragmento refere-se à perda de outra unidade de leucina (Fig. 27)

Figura 27. Experimento MS^3 realizado por ESI-CID/MS ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 932 o qual gerou o íon produto de *m/z* 818.



O experimento de MS^4 do íon produto de *m/z* 818, gerou o íon produto de *m/z* 703, indicando a perda sequencial de um aspartato na estrutura da molécula, através da perda de 115 Da (Fig. 28).

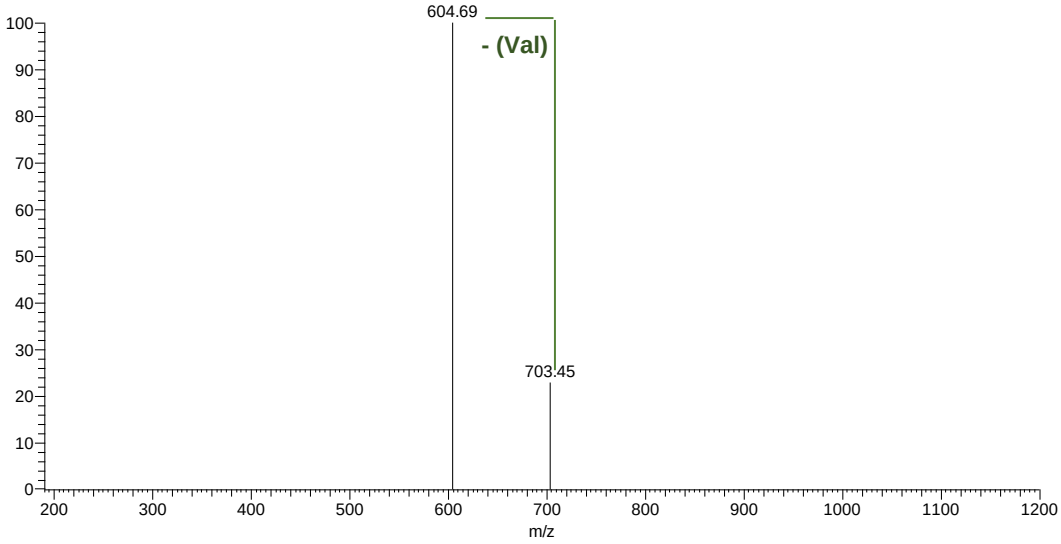
Figura 28. Experimento MS^4 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 819.



De acordo com a fragmentação obteve-se o íon produto de *m/z* 703.

Por outro lado, o experimento de MS^5 do íon produto de *m/z* 703, gerou o íon produto de *m/z* 604, indicando presença de mais uma valina na estrutura da molécula, através da perda de 99 Da (Fig.29).

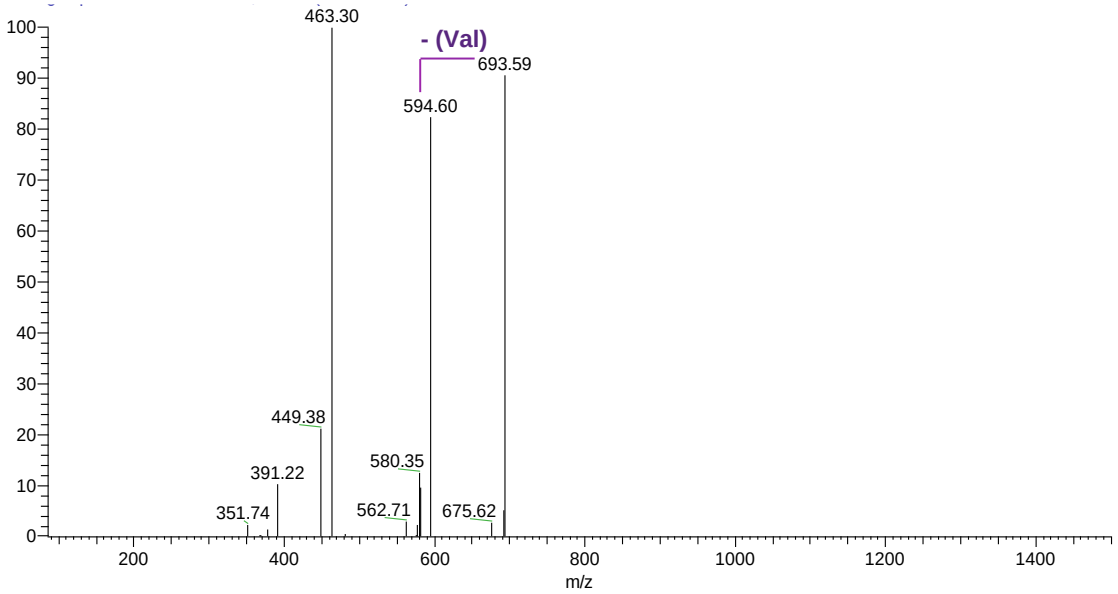
Figura 29. Experimento MS^5 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 703.



De acordo com a fragmentação obteve-se o íon produto de *m/z* 605.

O experimento de MS^3 a partir do íon de *m/z* 693, observou-se a formação do íon produto de *m/z* 595, o que permite inferir a existência de uma unidade de valina na estrutura em questão (Fig. 30)

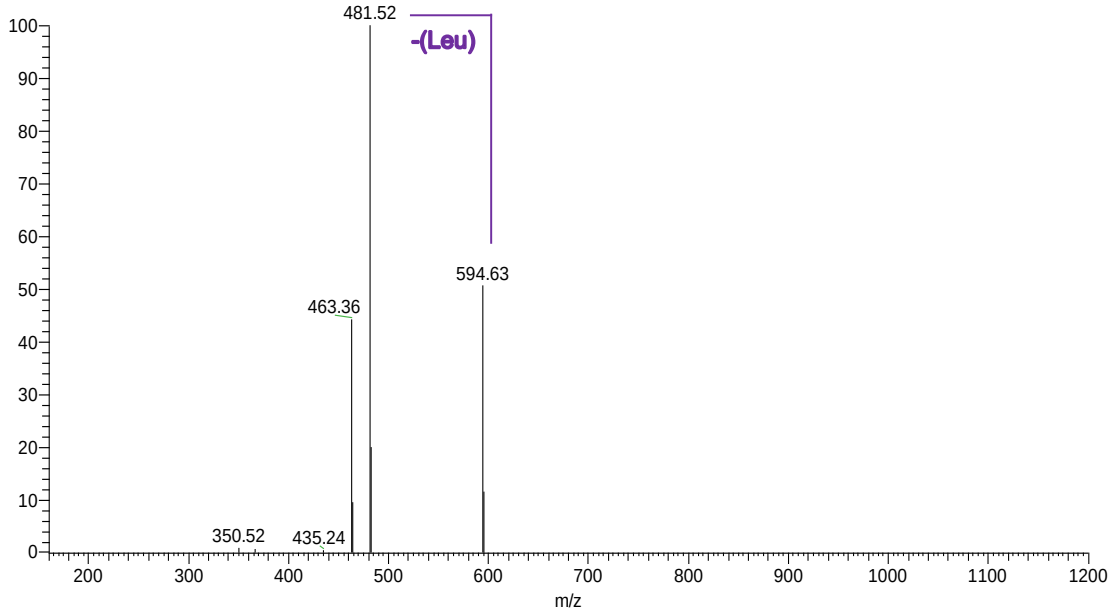
Figura 30. Experimento MS^3 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 1045.



De acordo com a fragmentação por CID obteve-se o seguinte íon produto de *m/z* 693.

O experimento de MS^4 a partir do íon de *m/z* 594 resultou na formação do íon de *m/z* 481, indicando a perda sequencial de uma unidade de leucina, através da perda de 113 Da (Fig. 31).

Figura 31. Experimento MS^4 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 693.

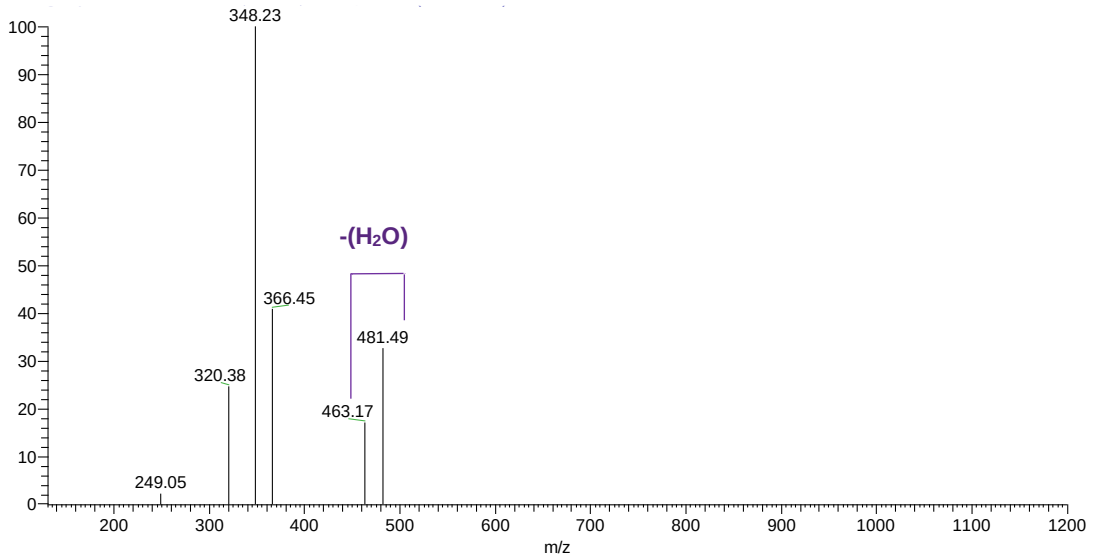


De acordo com a fragmentação por CID obteve-se o seguinte íon produto de *m/z* 594.

O experimento de MS^5 do íon de *m/z* 481, resultou na perda de 115 Da, indicando assim a perda

consecutiva de uma unidade de aspartato nesta molécula (Fig. 32).

Figura 32. Experimento MS^5 realizado por ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z* 594.



De acordo com a fragmentação obteve-se íon produto de *m/z* 481 e 463.

Experimentos adicionais envolvendo o íon de *m/z* 366, permitiram corroborar com a estrutura abaixo proposta para este heptapeptídeo (Tabela 1).

5.4.2.4. Isômero íon *m/z* 1045

No outro isômero de *m/z* 1045, conforme demonstrado através do cromatograma (Fig.33), observou-se também a mesma sequência peptídica de Leu/Ile-Leu-Asp-Val na primeira via de fragmentação, através dos fragmentos de *m/z* 932, 818, 703 e 604, respectivamente. Diferentemente da molécula anterior, esta possui o fragmento de *m/z* 708, o qual refere-se à perda da cadeia de ácido graxo associada uma unidade de glutamato. O experimento de MS^3 a partir deste fragmento, apresentou os fragmentos de *m/z* 594, 481 e 463 (referente a segunda via de fragmentação), os quais correspondem à perda de uma leucina/isoleucina, seguida de outra leucina/isoleucina e uma molécula de água, respectivamente. Estes dados permitem indicar a presença de outra surfactina (Tabela 1).

Figura 33. Full MS^2 ESI-CID/MS, ionização em modo positivo (35 eV) do espectro de massas do íon *m/z*1045. Nova estrutura. Em azul fragmentação da primeira via do anel lactona e em rosa a segunda via de fragmentação.

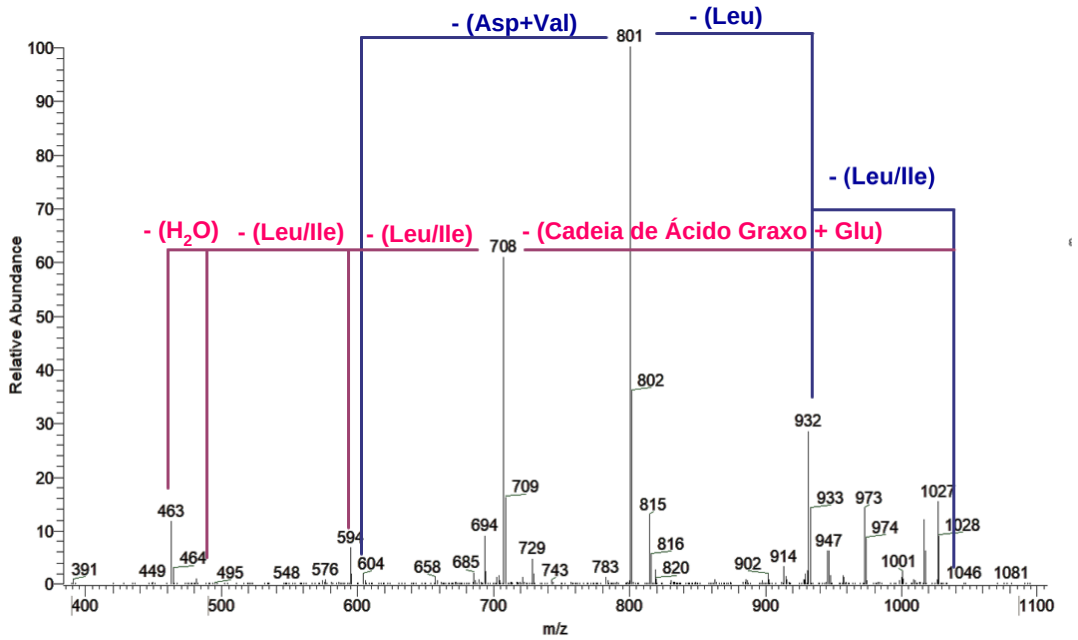


Tabela 1: Estruturas dos lipopeptídios cíclicos obtidos por ESI-CID/MS

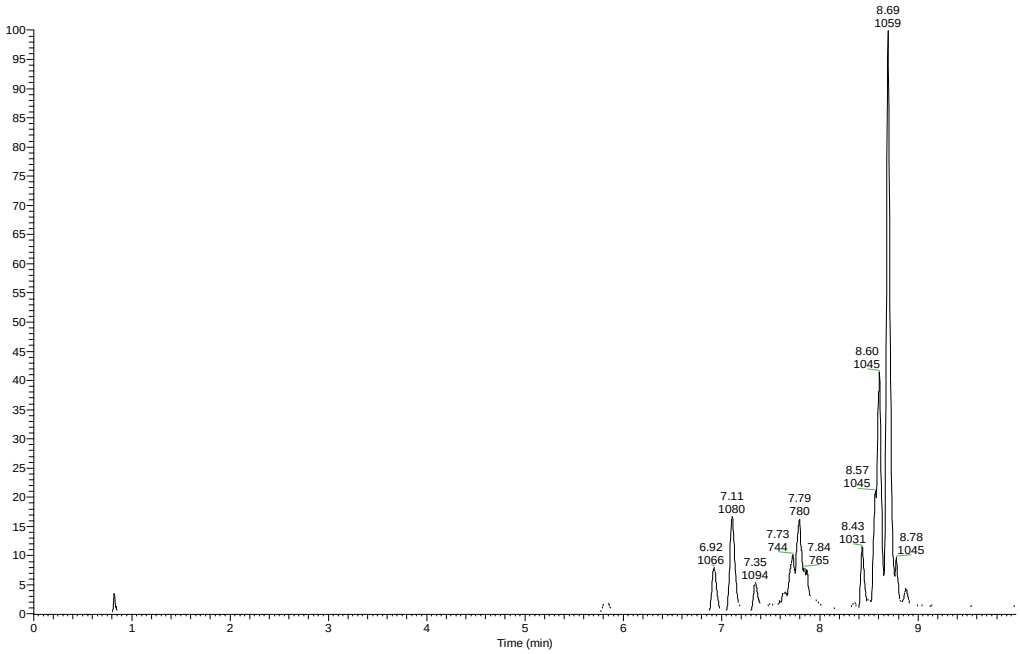
Massa (*m/z*)	Família	Atribuição	Estrutura
1059	**Surfactina (1)**	$C_{15}[M+Na]^+$	R_n-CH-CH_2-CO-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu/Ile O
1031	**Surfactina (2)**	$C_{13}[M+Na]^+$	R_n-CH-CH_2-CO-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu/Ile O
1045	**Surfactina (3)**	$C_{14}[M+Na]^+$	R_n-CH-CH_2-CO-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu/Ile O
1045	**Nova Estrutura (4)**	$C_{16}[M+Na]^+$	R_n-CH-CH_2-CO-Val-Leu-Asp-Val-Asp-Leu-Leu/Ile O

5.5. Análises Cromatográficas das Frações

5.5.1. Fração Sephadex 1

O fracionamento em coluna de permeação da FrOrg de *B. velezensis* resultou em 4 grupos de frações. A análise por UPLC-ESI-IT-MS da fração oriunda da FrSph1 resultou na separação e detecção de pelo menos, 11 metabólitos secundários nesta mistura (Fig.34). Sendo os majoritários os picos 1045 e seus isômeros e o pico 1059.

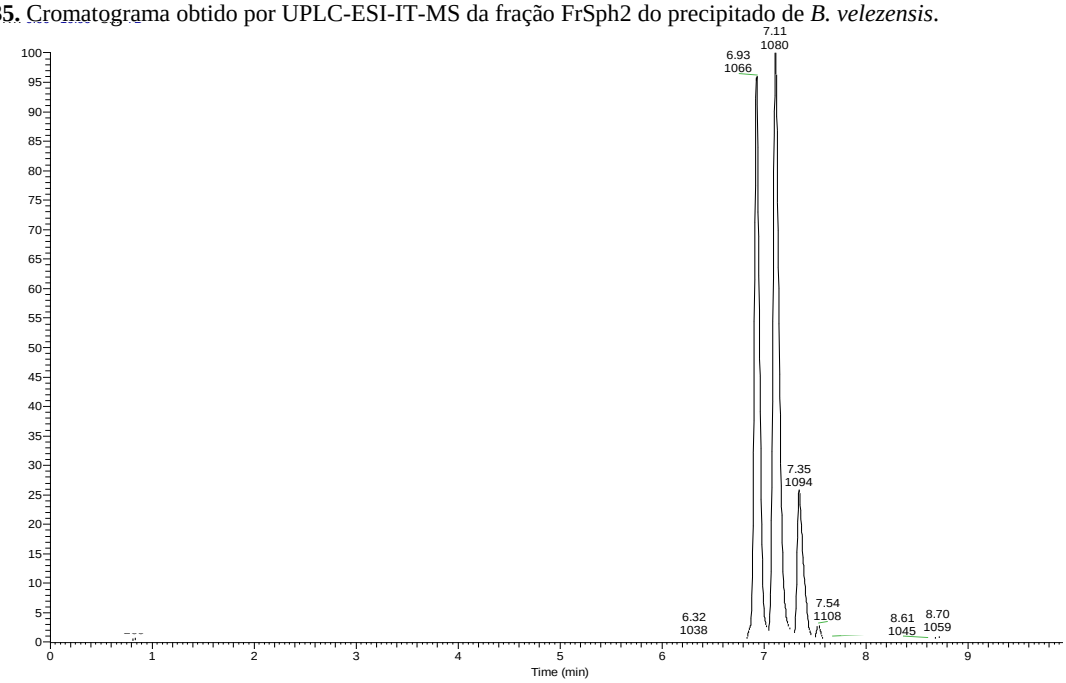
Figura 34. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph1 do precipitado de *B. velezensis*.



5.5.2. Fração Sephadex 2

A análise por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph2 de *B. velezensis* resultou na separação pelo menos, 5 picos nesta mistura (Fig.35), dos quais os de *m/z* 1080, 1066 e 1094 são os majoritários.

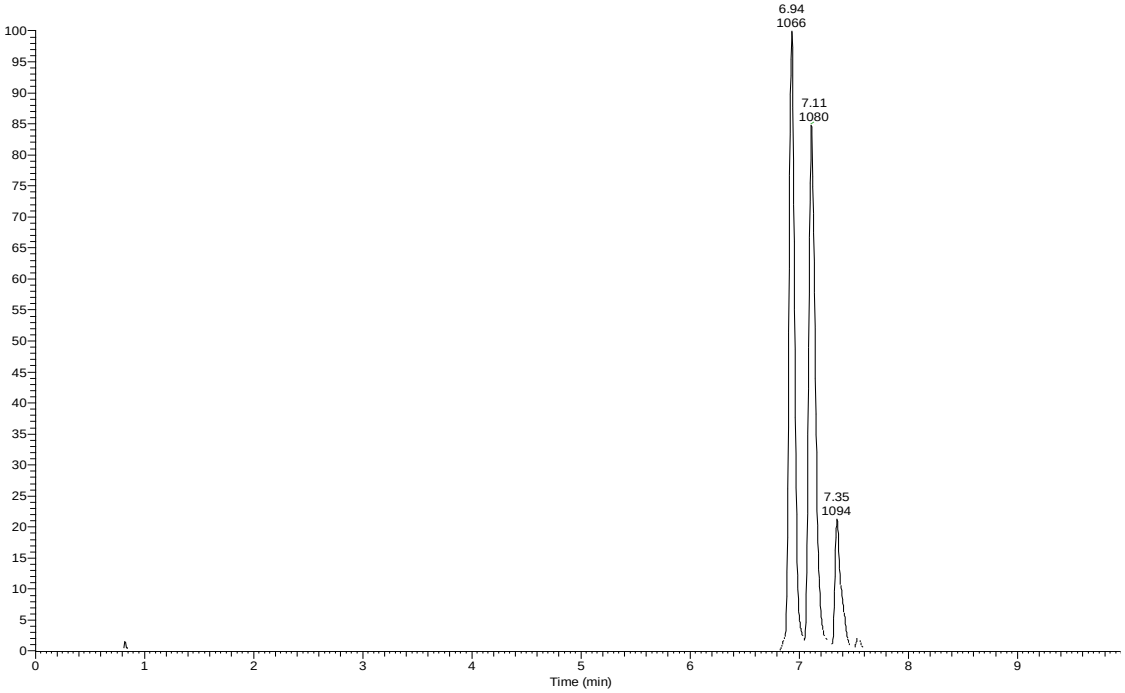
Figura 35. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph2 do precipitado de *B. velezensis*.



5.5.3. Fração Sephadex 3

A análise por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph3 de *B. velezensis* resultou na separação com presença de pelo menos, 3 picos nesta mistura (Fig.36).

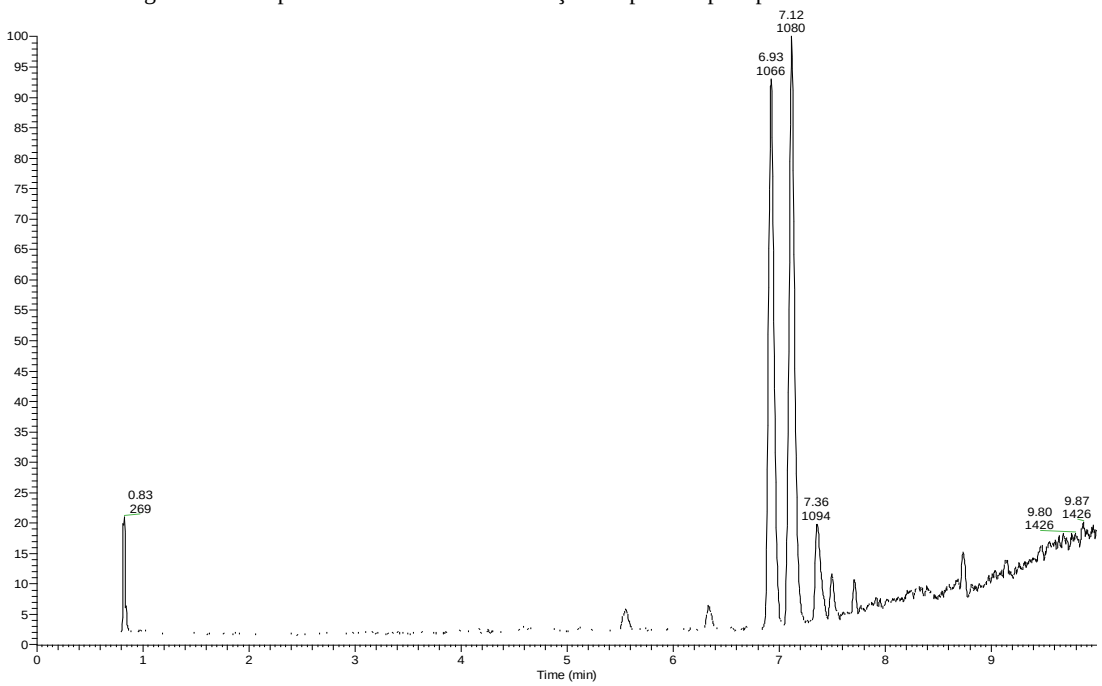
Figura 36. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph3 do precipitado de *B. velezensis*.



5.5.4. Fração Sephadex 4

A análise por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph4 de *B. velezensis* resultou na separação de pelo menos 6 picos nesta mistura (Fig. 37).

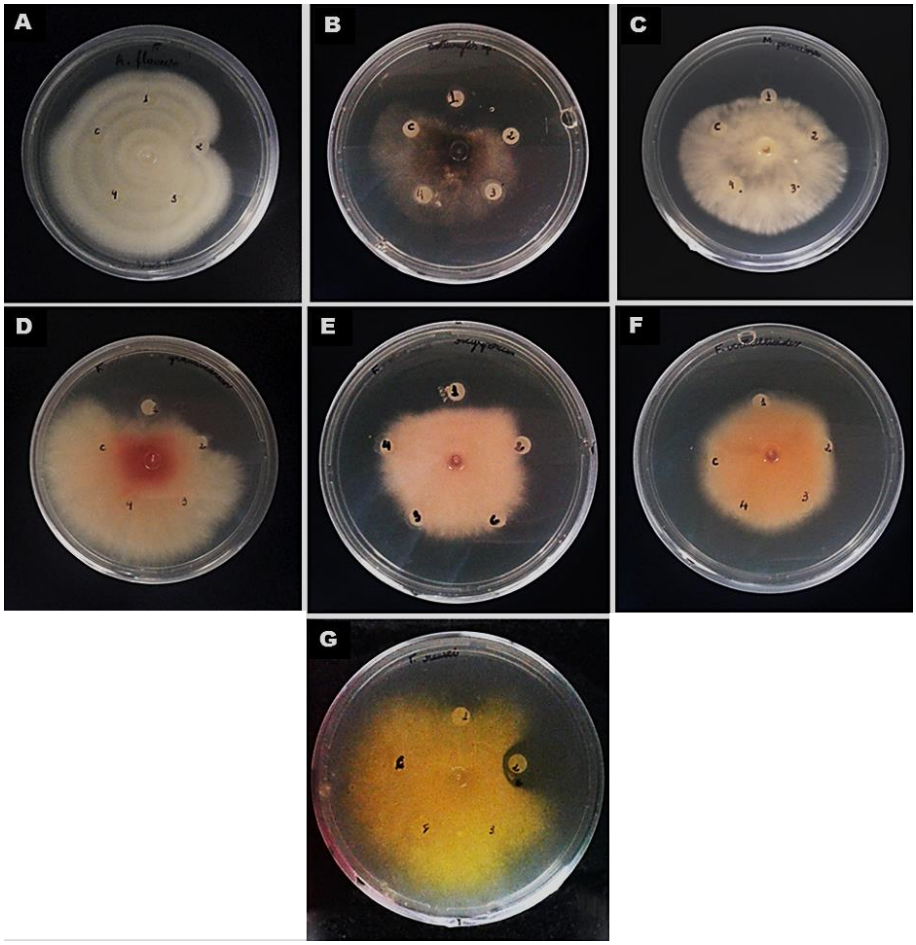
+Figura 37. Cromatograma obtido por UPLC-ESI-IT-MS da fração FrSph 4 do precipitado de *B. velezensis*.



5.6. Ensaio de Difusão em Ágar com os grupos de frações

O ensaio de difusão em ágar com os quatro grupos de frações obtidos da Sephadex revelou que FrSph 1 apresentou atividade antifúngica contra a maioria dos fungos fitopatogênicos. Apenas, contra o fungo *A. flavus* (Fig. 38 A) não houve uma atividade direta. Entretanto, FrSph 2 também apresentou atividade contra a maioria dos fungos de estudo, somente não é visível a atividade contra *M. perniciosa* (Fig.38 C). Já os grupos de frações 3 e 4, não apresentaram nenhum tipo de atividade antifúngica.

Figura 38. Ensaio de difusão em disco com as frações (1) -FrSph1, 2- (FrSph2), 3- (FrSph3), 4- (FrSph4) e C – (Controle DMSO) contra os fungos fitopatogênicos (A) *Aspergillus flavus*, (B) *Bothrytis* sp., (C) *M. perniciosa*, (D) *Fusarium graminearum*, (E) *F. oxysporum*, (F) *F. verticillioides* e (G) *T. reesei*. Aliquotou-se 10 µL (1mg mL^{-1}) de cada fração em discos de papéis estéreis e aplicou-se sobre PDA. No centro da placa aplicou-se 10^4 conídios/mL dos fungos fitopatogênicos e incubou-se por 4 dias a 25°C ± 2.



6. DISCUSSÃO

A identificação molecular de espécies de bactérias do gênero *Bacillus* muitos estudos têm escolhido a região 16S rDNA para a realização de árvores filogenéticas, por ser uma região bastante conservada, de maneira a propiciar a detecção de possíveis relações entre espécies distantes (WOESE & FOX, 1977; WISOTZJSEY et al., 1992). As análises da região 16S rDNA permitiu reconstruir uma árvore filogenética na qual a bactéria de estudo encontra-se no mesmo clado da espécie *B. velezensis* (Fig. 5). Embora o suporte (valor de bootstrap) não esteja próximo de 100%, mas de 68%, este é um valor considerável, dada as características conservadoras da análise de confiança gerada pelo bootstrap não-paramétrico.

Vários estudos mostram as potencialidades dos metabólitos secundários obtidos através do extrato bruto de bactérias do gênero *Bacillus.* Tais extratos apresentaram grande potencial inibitório quando testados contra vários outros micro-organismos, apresentando alta atividade antimicrobiana (SCHULTZ, 2003), antifúngica (WONG et al., 2008, WONG et al., 2009) entre outras. Desta forma, ensaios foram realizados para analisar o efeito inibitório dos metabólitos secretados pela bactéria *B. velezensis* isolada em nosso laboratório sobre o crescimento de fungos filamentosos fitopatogênicos.

Verificou-se o efeito inibitório dos metabólitos secretados pela cepa bacteriana sobre o crescimento de *T. reesei* QM9414. Os resultados demonstraram o potencial inibitório que o metabólito secretado por *B. velezensis* apresentou contra tal fungo (Fig. 5). Na literatura, há estudos de inibição onde este fungo filamentoso é escolhido para este tipo de análise. Fuentes (2004) indicou que proteínas tais como Canacistatina RZ2001 obtida de cana-de-açúcar e a proteína cistatina de painço obtida de *Pennisetum glaucum,* em pequenas quantidades, causam inibição em fungos filamentosos fitopatogênicos e não patogênicos como *T. reesei*.

Mediante os resultados obtidos com o ensaio *in vitro* contra *T. reesei*, foram testadas as atividades frente aos fungos fitopatogênicos *A. flavus*, *Bothrytis* sp., *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* e *M. perniciosa.* Os resultados permitiram confirmar que os metabólitos produzidos por *B. velezensis* também apresentam atividade inibitória contra estes fungos. De acordo com a literatura, a eficiência de inibição de fungos por meio de extratos brutos, se deve à presença de lipopeptídeos e proteínas encontradas em *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, e entre outras espécies de *Bacillus*. Esta ação permitiu sugerir que os lipopeptídeos produzidos por bactérias deste gênero, poderiam ser uma alternativa na substituição de defensivos agrícolas, pois apresentaram potencial para o tratamento das lavouras de modo similar ao dos agroquímicos empregados. Estas espécies anteriormente citadas, são consideradas não toxigênicas e seguras para serem utilizadas na agricultura, como tratamentos para humanos e para propósitos veterinários. Alguns estudos já mostraram compostos bioativos obtidos a

partir deste tipo de micro-organismo (BENITEZ et al., 2012; CHEN et al., 2008; JEMIL et al., 2017; SCHULZ et al., 2005).

Dos meios de culturas empregados neste estudo, o caldo BD se mostrou o mais efetivo para uma maior produção de metabólitos secundários. A composição deste meio por apresentar diferentes fontes de carbono como dextrose e o amido, contido na batata, podem ter colaborado para esta maior produção, além do custo para produção deste caldo ser mais barato do que os outros meios de cultura. SALAMONI, GERMANI, VAN DER SAND (2012) observaram uma maior produção da biomassa e metabólitos por *Streptomyces* ao usarem um meio de cultura contendo extrato de malte e glicose, que são fontes de carbono. No trabalho descrito por YULIAR (2005), a adição de ácido palmítico no meio de cultura melhorou a produção de iturina por *B. subtillis* RB14-CS. Mostrando assim que os componentes do meio de cultura e a adição de nutrientes podem influenciar na quantidade e variedade de metabólitos a serem produzidos pelas bactérias.

Em função da atividade antagonistíca observada nos ensaios *in vitro* contra os fungos fitopatogênicos, partiu-se para as análises de identificação e caracterização estrutural dos metabólitos secundários secretados. Neste sentido, foram realizadas análises por CCD e CCDP, as quais permitiram obter a fração FrOrg. Após análises realizadas por LC-ESI-MS/MS, revelaram que esta se tratava de uma mistura de pelo menos 6 metabólitos secundários, com *m/z* 1059, 1045, 1031 e 1093 sendo que os metabólitos de *m/z* 1059 e 1045 apresentaram isômeros após a purificação. De acordo com a literatura, os extratos metanólicos de *B. megaterium* apresentaram a presença de isômeros, além da confirmação de moléculas oriundas da família da surfactina com massas similares as apresentadas (MA et al., 2016; PECCI et al.; 2010).

Vários experimentos de ESI-MS^n foram realizados a partir dos íons de *m/z* 1030, 1045 e 1059 da FrOrg. Os experimentos realizados para o íon $[M+Na]^+$ de *m/z*1059 permitiu visualizar duas vias diferentes de fragmentação a partir deste íon (Fig. 14 a 20). Para a primeira via, foram observados os fragmentos de *m/z* 1041, 946, 833, 718 e 619, os quais correspondem à perda sequencial de H_2O, Leu/Ile, Leu/Ile, Asp e Val, respectivamente. Já a segunda via de fragmentação, se dá pela perda inicial da cadeia carbônica do ácido graxo β-hidroxílico (C_{15}) associado à uma unidade de glutamato, fornecendo o íon de *m/z* 708 (Fig. 14). Este íon por sua vez, gera os íons de *m/z* 595, 481 e 463, através da perda sequencial de Leu/Ile, Leu/Ile e H_2O. Estes tipos de fragmentações foram descritos previamente por JEMIL et al. (2017) e PECCI et al. (2010), os quais mostraram a abertura da estrutura cíclica contida na molécula e as perdas sequenciais dos aminoácidos referente à cada porção desta abertura. Os nossos resultados referentes aos fragmentos de cada via da abertura da molécula, estão de acordo com aqueles reportados por estes autores. Logo, estes dados nos permitem indicar que esta molécula corresponde a uma surfactina (**1**) previamente identificada no extrato de *Bacillus megaterium* (MA et al., 2016), *B. subtilis* C-1 (VALTER et al., 2002; HADDAD et al., 2008) e *B. amyloliquefaciens* (YAN et al., 2012; ZOUARI

et al., 2016) identificada por LC-ESI/MS.

De modo análogo à molécula descrita anteriormente, realizou-se experimentos para o íon $[M+Na]^+$ de *m/z* 1031. Foi observado um mesmo padrão de fragmentação visto para o íon de *m/z* 1059. Na primeira via de fragmentação foram observados os seguintes fragmentos de *m/z* 918, 805, 787, 689, 672 e 590, (Tabela 1), os quais indicam a perda sequencial dos aminoácidos Leu/Ile-Leu/Ile-H_2O-Asp-H_2O-Val (figuras 21, 22 e 23). Já na segunda via de fragmentação apresentada na figura 21, observa-se a perda da cadeia do ácido graxo β- hidroxílico (C_{13}), com a presença adicional de uma unidade de glutamato. A partir deste último fragmento, observou-se as perdas dos aminoácidos Leu/Ile-Leu/Ile. Logo, tais dados também permitem inferir que esta cadeia de ácido graxo β-hidroxílico está associada a uma cadeia heptapeptídica cíclica, assim indicando mais uma molécula de surfactina (**2**). Esta molécula foi também anteriormente descrita por JEMIL et al. (2017) para o *B. methylotrophicus* DCS1. Este padrão de fragmentação da molécula de surfactina (**2**) foi também descrita por CHEN et al. (2008) e PECCI et al. (2010) em seus trabalhos.

As análises por UPLC-ESI-IT-MS da FrOrg de *B. velezensis* revelou a presença de mais de um composto com *m/z* 1045 (Fig. 12). Através dos experimentos de MS^n foi possível caracterizar a fragmentação de dois isômeros. De modo análogo aos íons de *m/z* 1031 e 1059, um dos íons de *m/z* 1045 também apresenta uma similar abertura na estrutura da molécula, permitindo inferir que a mesma apresenta um lipopeptídico. Na primeira via de fragmentação a partir do íon precursor de *m/z* 1045, foram observados os íons de *m/z* 932, 801 e 604 que se referem às perdas consecutivas de Leu/Ile-Leu/Ile-Asp-Val. Já na segunda via, foram observados os fragmentos dos íons de *m/z* 708, 595, 481 e 463, os quais referem-se à perda de uma Leu/Ile-Leu/Ile-H_2O, respectivamente. Contudo, a cadeia de ácido graxo do tipo β-hidroxílico para este íon é uma cadeia de catorze carbonos (C_{14}), o qual foi observado também no trabalho de JEMIL et al. (2017).

No isômero de *m/z* 1045, observou-se também as duas vias de fragmentação (Fig. 34). Na primeira via foram observados os fragmentos de *m/z* 932, 819, 703 e 605, os quais correspondem às perdas de uma Leu/Ile-Leu/Ile-Asp-Val, respectivamente. Na segunda via de fragmentação foram visualizados os íons de *m/z* 693, 594, 481 e 366, os quais correspondem às perdas dos aminoácidos Val-Leu/Ile-Asp. As análises destes dados permitem sugerir que a molécula possui uma cadeia de ácido graxo de C_{16}. As estruturas apresentadas na literatura para a família da surfactina, apresentam sempre o glutamato como sendo o primeiro aminoácido ligado à cadeia do ácido graxo, o que não é observado para o metabólito em questão, pois este inicia-se com uma unidade de Valina. A unidade de glutamato diretamente ligada à cadeia de ácido graxo, é considerada como sendo um resíduo na composição de moléculas pertencentes a esta família de lipopeptídeos, além da variação entre outros aminoácidos na quarta e sétima posição da estrutura cíclica da molécula de surfactina (BONMATIN et al., 2003; JEMIL et al., 20017). Comparando esta estrutura deste metabólito secundário com as outras pertencentes às

famílias de iturina e fengicina, foi possível constatar que não houve similaridade no sequenciamento dos aminoácidos com aquelas já descritas anteriormente (BONMATIN et al., 2003; MA et al. 2016). Um criterioso levantamento bibliográfico utilizando-se a base de dados Scifinder (https://scifinder-cas.ez67.periodicos.capes.gov.br/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf), indicou que a estrutura da molécula lipopeptídica de *m/z* 1045 obtida de *B. velezensis* não foi descrita até o dado momento.

Os ensaios biológicos com as frações obtidas através do fracionamento em coluna de permeação em gel do precipitado mostraram que as frações 1 (FrSph 1) e 2 (FrSph 2) apresentaram atividade antifúngica. Entretanto, as amostras 3 (FrSph 3) e 4 (FrSph 4) foram inativas. As análises dos dados obtidos por UPLC-ESI-IS-MS e ESI-MS^n mostraram que o perfil cromatográfico de FrSph 1 é bastante diferente dos cromatogramas das frações FrSph 2, FrSph 3 e FrSph 4. A presença dos íons de *m/z* 1031, 1045 e 1059 indicam a presença das moléculas de surfactinas (**1**, **2** e **3**) e a nova molécula (**4**), juntamente com outros picos minoritários de *m/z* 1066, 1080 e 1094. Como estes metabólitos diferem entre si de 14 Da, e apresentam as mesmas *m/z* de moléculas da família da iturina ocorrentes em *B. amyloliquefaciens* e *B. subtillis*, é possível sugerir que também sejam compostos pertencentes à mesma família (PATHAK et al. (2014), PECCI et al. (2010) e ROMERO et al. (2007).

Analisando-se o cromatograma da FrSph2, observou-se um perfil químico similar, porém com a inversão da quantidade destes metabólitos, sendo mais proeminentes os derivados da família da iturina do que os da surfactina de *m/z* 1045 e 1059, os quais foram identificados neste trabalho.

Já os perfis cromatográficos das frações FrSph 3 e FrSph4 mostraram que estas detinham os derivados da família iturina e não mostraram ação antifúngica. Desta maneira, sugere-se que a presença das surfactinas (**1**, **2**, **3** e **4**) na FrSph1 e na FrSph 2 promovem a ação antifúngica.

Segundo MAGET-DANA et al. (1992) existe um efeito sinérgico entre a surfactina e a iturina, de forma que a surfactina aumenta a atividade antibiótica da iturina. Em seu trabalho MAGET-DANA et al. (1992) também infere que o caráter de surfactante que a surfactina apresenta colabora de tal forma que a iturina alcance e perturbe a membrana das células alvo. E, além disto, que a produção deste dois lipopeptídios funcionando como um complexo que provavelmente estejam envolvidos na regulação do crescimento da bactéria que a produz.

7. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu concluir que:

1. Análise filogenética da região 16S rDNA permitiu identificar a bactéria deste estudo como *Bacillus velezensis;*

2. Os ensaios antagonísticos entre a bactéria *B. velezensis* e os fungos filamentosos *T. reesei* QM9414, *F. graminearum, F. oxysporum, A. flavus* e *Bothrytis sp.* mostraram a potencialidade existente nos metabólitos produzidos pela bactéria para inibir o crescimento dos fungos em placa;

3. Análises realizadas por meio de CCD e CCDP permitiram a obtenção de uma fração de metabólitos a qual, após análise por UPLC-MS, permitiu-se identificar que a fração se tratava de uma mistura de metabólitos;

4. Por intermédio de estudos realizados através de ESI-CID/MS concomitantemente com dados da literatura permitiram realizar a caracterização das estruturas de 04 moléculas obtidas de *B. velezensis*, onde uma delas ainda não foi descrita na literatura.

5. Separação por cromatografia de permeação em gel permitiu obter quatro grupos de frações FrSph 1, FrSph 2, FrSph 3 e FrSph 4. As injeções das frações revelaram que a FrSph 1 apresentou um perfil cromatográfico diferente dos outros, pois continha as moléculas de surfactinas que foram caracterizadas neste estudo, assim como a molécula nova, além dos íons de *m/z* 1066, 1080 e 1094, os quais podem pertencer à família da iturina, já que foram encontrados concomitantemente com derivados de surfactina em outras espécies de *Bacillus*.

6. As amostras FrSph 2, FrSph 3 e FrSph 4 apresentaram um perfil bastante semelhante, também apresentando os íons de *m/z* 1066, 1080 e 1094 oriundos da família da iturina, todavia, a amostra FrSph 2 contém pequenos picos referentes aos íons de *m/z* 1045 e 1059 que são da família da surfactina.

7. O ensaio de difusão em disco permitiu constatar que a fração FrSph 1 apresenta atividade antifúngica contra a maioria dos os fungos fitopatogênicos estudados neste trabalho, exceto contra o fungo *A. flavus*, provavelmente porque na fração 2 havia uma maior quantidade de iturina do que na fração 1.

8. A fração FrSph 2 também apresentou atividade, mas não contra todos os fungos e isto também pode ser porque nesta fração a quantidade de surfactina é baixa, logo não potencializando sua ação contra todos os fungos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ADAPAR – Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=335> Acesso em 26/01/2016

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*, 1990. v.215, nº3, p. 403-410.

ALVAREZ, F.; CASTRO, M.; PRÍNCIPE, A.; BORIOLI, G.; FISCHER, S.; MORI, G.; JOFRE, E. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strain MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptídeos iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 2011. v. 112, p.159-174.

BEISSWENGER, C., HESS, C. E BALS, R. *Aspergillus fumigatus* conidia induce interferon-b signaling in respiratory epithelial cells. *European Respiratory Journal*, 2012. v. 39, p. 411–418.

BENITEZ, B. L.; VELHO, R. V.; LISBOA, M. P.; MEDINA, L. F. da C.; BRANDELLI, A. Isolation and Characterization of Antifungal Peptides Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *The Journal of Microbiology*, 2010. vol. 48, n°6, p. 791-797

BENITEZ, L. B. Caracterização de peptídeos antimicrobianos de *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade antibacteriana, antifúngica e amebicida. 2010. 169 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

BENITEZ, L. B.; VELHO, R. V., MOTTA, A. S., SEGALIN, J., BRANDELLI, A. Antimicrobial factor from Bacillus *amyloliquefaciens* inhibits Paenibacillus larvae, the causative agent of american foulbrood. *Arch Microbiol*. 2012, n°. 194, p. 177-185.

BOMBARDI, L. M. Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: a nova versão do capitalismo oligopolizado. *Boletim Data Luta*, 2011. v. 45, p. 1-21.

BONMATIN, J-M.; LAPRÉVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity Among Microbial Cyclic Lipopeptides: Iturins and Surfactins. Activity-Structure Relationships to Design New Bioactive Agents. *Combinatorial Chemistry & Hight Throughput Screening*, 2003. vol.6, n°6, p. 541-556.

BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of Bacillus thuringiensis based biopesticides. Process Biochemistry, New York, vol. 41, n. 2, p. 323-342, 2006.

CALTAGIRONE, L. E. Definitions and Principles of Biological Control. In. 2nd International Short Course in Biological Control, Berkeley, 1988.

CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N. Bacillus thuringiensis: formulações e plantas transgênicas. In: BORÉM, A. (Ed.). *Biotecnologia e meio ambiente*. Viçosa: Folha de Viçosa, 2004. p. 309-350.

CARALLO, E. M. & FILHO, H. P. S. Manual Básico de Técnicas Fitopatológicas: Laboratório de Fitopatologia Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2016. 1° ed., p.109.

CHEN, H.; WANG, L.; SU, C.X.; GONG, G.H.; WANG, P.; YU, Z.L. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis. Letters in Applied Microbiology*. 2008, vol.47, p. 180-186.

CONNELL, J. H. On the prevalence and relative importance of interspecific competition: Evidence from field experiments. *The American Naturalist*, 1983. vol. 122, n° 5, p. 691-696.

CORRÊA, ÉLIDA BARBOSA. Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) em cultivos hidropônicos. 2009. 133f. Tese (Doutorado em Ciências Agronômicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2009.

CORTÉS, J. A. L. & RUSSI, J. A. N. Echinocandins. *Revista Chilena de Infectología, 2011*. vol. 28, n° 6, p. 529-536.

DARWICHE, R.; ATAB, O. E.; BARONI, R. M.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; MONDEGO, J. M. C.; PEREIRA, G. A. G.; SCHEITER, R. Plant pathogenesis-related proteins of the cacao fungal *Moniliophthora perniciosa* differ in their lipid-binding specificities. *Journal Biological Chemistry.* 2017, vol. 292, n° 50, p. 20558-20569.

DEBACH, P. Biological Control of Insect Pests and Weeds. New York, *Reinhold*, 1964. p. 844

DEBACH, P.; ROSEN, D. 1991. Biological control by natural enemies. University Press, Cambridge. 440p.

DEITHIER, V.G. Evolution of feeding preferences in phytophagous insects. *Evolution*, 1954. vol. 8., p. 33-54.

DEMAIN, L. A. & FANG, A. The Natural Functions of Secondary Metabolites In: DEMAIN, L. A. & FANG, A. *History of Modern Biotechnology I. Springer Berlin Heidelberg*, 2000. vol. 69, p.1-39. (Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology)

DIAS, P. P. Controle biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* e sua contribuição no crescimento de plantas. 2011. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal rural do Rio de Janeiro –Instituto de Agronomia, Rio de Janeiro, 2011.

DIKSHIT, A.; MISHARA, B. K.; MISHRA, R. K; MISHRA, R.C.; TIWAEI, A. K.; YADAV, R.S.; Biocontrole efficacy of *Trichoderma viride* isolates against fungal plant pathogens causing disease in *Vigna radiate* L. *Archives of Applied Science Research*, 2011. vol. 3, n° 2. p. 361-369.

DUNLAP, C. A.; KIM, S. J.; KWON, S. W.; ROONEY, A. P. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016. vol. 66, n°3, p. 1212-1217.

EMPRAPA :Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Técnicas de Produção de Soja Região Central do Brasil. 2004 Disponível em <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/rotacao.htm> Acesso em 13/11/2015.

EUZEBY, J. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, 1997 - Genus Bacillus. Diponível em: http://www.bacterio.net/bacillus.html. Acesso em 04/06/2018.

EWING, B. & GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, 1998. vol. 8, nº 3, p. 186-194

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genoma Research*, 1998. vol.8, n°3, p. 175-185.

FILHO, A. B. & da SILVA, E. M. Observações sobre o parasitismo de *Neodusmetia sangwani* sobre a cochonilha *(Antonina graminis)*. *Pesquisa agropecuária Brasileira*, 1988. vol. 23, n°3, p. 329-331.

FILHO, B. E. & CIOCIOLA, A. I. Parasitóides ou predadores? Vantagens e Desvantagens. In*:* BENTO, J. M. S.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; PARRA, J. R. P. Ed(s). *Controle Biológico no Brasil:* Parasitóides e Predadores. São Paulo: Manole Ltda, 2002. p. 29-41

FORMIGHIERI, E. F. Genoma de *Moniliophthora perniciosa: montagem e anotação da mitocôndria e desenvolvimento de sistema de anotação semi-automático de genes.* 2006.172f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Biologia, Campinas, 2006.

FRAENKEL, G.S. The raison s'être of secondary plant substances. *Science*, 1959. vol. 129, p. 1466-1470.

FUENTE, A. S. da C. Expressão Heteróloga, Purificação e Estudos de Atividades de uma proteína inibidora de cisteíno protease da cana-de-açúcar e posterior evolução in vitro pela técnica de DNA Shuffling. 2004.101 f. Tese (Doutorado em Genética Molecular na área de Bioquímica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2004.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, RP.L.; BATISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B. Manual de entomologia agrícola. São Paulo: Ed. *Agronômica Ceres*, 1978, p. 531

GARRIGUES, S.; GANDÍA, M.; MARCOS, J. F. Occurrence and function of fungal antifungal proteins: a case study of the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. *Applied Microbiology Biotechnol*ogy, 2016. vol.100, p. 2243-2256.

GÓMEZ, B.L. Histoplasmosis: Epidemiology in Latin America. *Current Fungal Infections Reports*, 2011. vol. 5, n°4, p. 199-205.

GONÇALVEZ, L. Fatos Históricos do Controle Biológico. *Floresta e Ambiente*, 1996. ano 3, p.96-101.

GORDON, D. Viewing and editing assembled sequences using Consend. In: BAXEVANIS, A. D.; DAVISON, D. B. Ed(s). *Current Protocols in Bioinformatics*. New York: John Wiley & Co, 2004, 11.2.1 – 11.2.43.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, 1998. vol.8, n º3, p. 195-202.

GORDON, D.; DESMARAIS, C.; GREEN, P. Automated finishing with Autofinish. *Genome Research*, 2001. vol. 11, p. 614-625.

GRAVENA, S. Controle Biológico no Manejo Integrado de Pragas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*,1992, vol.27, p. 281-299.

HADDAD, N. I. A.; LIU, X.; YANG, S.; MU, B. Surfactin Isoforms from *Bacillus subtilis* HSO121: Separation and Characterization. *Protein & Peptide Letters.* 2008, vol. 15, p. 265-269.

HO, V.S., WONG, J.H., NG, T.B. A thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana. *Peptides*, 2007. n° 28, p. 760–766.

HOPWOOD, K A. & SHERMAN, D.H. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annual Review of Genetics*, 1990. vol.24., p. 37-66.

HUFFAKER, C. B. & MESSENGER, P. S. Theory and Practice of Biological Control. Califórnia: *Academic Press*, 1976, p. 788.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Consumo de agrotóxicos no Brasil Disponível em: Acesso em 11/12/2017

JEMIL, N.; MANRESA, A.; RANAL, F.; AYED, H. B.; HMMIDET, N.; NASRI, M. Structural characterization and Identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain. *Journal of Chromatography B*, 2017. vol. 1060, p. 374-386

KIMATI, H. Controle Químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. vol.1, p. 761-785.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotides sequences. *Journal Molecular Evolution*, 1980. vol.16, n°2, p. 111-120.

KNOGGE, W. Fungal infection of plants. *The Plant Cell*, 1996. vol. 8, p.1711-1722.

KUMAR, S.; STENCHER, G.; TAMURA, K. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets.

LIMA, MIRTES FREITAS. "Diagnóstico de doenças em plantas e frutos de mangueira no Submédio do Vale do São Francisco." *Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: O AGRONEGÓCIO manga: produção e mercado. Vitória da Conquista: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2002.

MA, Y.; KONG, Q.; Qin, C.; CHEN, Y.; LV, R.; ZHOU, G. Identification of lipopeptides in Bacillus megaterium by two-step ultration and LC-ESI-MS/MS. *AMB Express*, 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Micro-organismos e Microbiologia. In:_____. *Microbiologia de Brock.* Tradução: MARANHÃO, A. Q.; de LIMA, B. D.; KYAW, C. M. Porto

Alegre: *Artmed*, 2010. 12 ed., p.34, 40.

MAGET-DANA, R. & PTAK, M. Iturin lipopeptide: interaction of mycosubtilin with lipids in planar membranes and mixed monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biommbranes*, 1990. vol. 1023, p. 34-40.

MAGET-DANA, R.; THIMON, L. PTAK, M. Surfactin/Iturin A interaction may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochime*, 1992. vol.74, p. 1047-1051.

Merck, Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography. E. Merck, Darmstadt, 1971. p. 118

MNIF, I. & GHRIBI, D. Lipopeptides Biosurfactants: Mean Classes and New Insights for Industrial, Biomedical, and Environmental Applications. *Biopolymers (Peptide Science)*, 2015. vol. 104, n° 3, p. 129-143.

MONGKOLTHANARUK, W. Classification of *Bacillus* Beneficial Substances Related to Plants, Humans and Animals. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012. vol. 22, n° 12, p. 1597-1604.

MORANDI, M. A. B. & BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: MORANDI, M. A. B. & BETTIOL, W. Ed(s). *Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas*. Jaguariúna: EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 2009. 1°ed., p. 7-14.

MORANDI, M. A. B.; JÚNIOR, T. J. de P.; BETTIOL, W.; TEIXEIRA, H. Controle Biológico de Fungos Fitopatogênicos. In: Lacerda, V. Ed. *Informe Agropecuário: Controle Biológico de Pragas, Doenças e Plantas Invasoras*. Minas Gerais: EPAMIG, 2009. vol.30, n° 251, p.73 – 81.

MORRIS, M. I. & VILLMANN, M. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 2006. vol. 63, p. 1693-1703

NUNES, W. Manejo de fungos do solo na cultura do feijão irrigado. In: FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. (Ed.) Feijão Irrigado: Tecnologia e produtividade. Piracicaba: ESALQ, 2003. p. 127-151.

OLIVEIRA M. A.; MARACUJÁ P. B.; FILHO, E. T.D.; LINHARES, P. C. F. Controle Biológico de Pragas em Cultivo Comerciais como Alternativa ao uso de Agratóxicos. *Revista Verde de Agroecologia e desenvolvimento Sustentável*, 2006. Vol. 1, n°. 2; p. 1-9

ONGENA, M.; JACQUES, P.; TOURÉ, Y.; DESTAIN, J.; JABRANE, A.; THONART, P. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005. vol. 69, p. 29-38.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO.J.M.S. Controle Biológico: Terminologia. In*:*_____. Ed(s). *Controle Biológico no Brasil:* Parasitóides e Predadores. São Paulo: Manole Ltda, 2002, p. 1-14.

PATHAK, K. V. & KEHARIA, H. Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtillis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis)* tree using mass spectrometry. *3 Biotech*, 2014. vol. 4, p. 283-295.

PECCI, Y.; RIVARDO, F.; MARTINOTTI, M. G.; ALLEGRONE, G. LC/ESI-MS/MS characterization of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. *Journal of Mass Spectrometry*, 2010. v.45, p.772-778.

PELCZAR Jr, M.J.; CHAN, E.C.S. e KRIEG, N.R. Microbiologia, vol. II, 2a ed. - São Paulo: *Makron Books*, 1996.

PETRY, G.L. Atividade fitotóxica de extratos e exsudatos radiculares de *Guilandina bonduc* (Fabaceae). 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

Protocolo JGl para extração de DNA genômico de bactéria. Disponível em: http://jgi.doe.gov/wp-content/uploads/2014/02/JGI-Bacterial-DNA-isolation-CTAB-Protocol-2012.pdf. Acesso em 13/04/2017.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Biologia Vegetal. 5° ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan.*, 1996., p. 748.

RAW, I; MENNUNCI L.; KRASILCHIK, M. A Biologia e o Homem, vol. 4 - São Paulo: *Editora da Universidade de São Paulo (EDUSP)*, 2001.

RELATÓRIO PARA A ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA OS DIREITOS HUMANOS (OHCHR) 2017.Disponível em: http://agripa.org//download-doc/137213. Acesso em: 28/04/2017.

RELATÓRIO PARA ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO (FAO) 2015. Diponível em: http://www.agri-outlook.org. Acesso em: 28/04/2017

ROMERO, D.; VICENTE, A.; RAKOTOALY, R.H.; DUFOUR, S.E.; VEENING, J. W.; ARREBOLA, E.; CAZORLA, F. M.; KUIPERS, O. P.; PAQUOT, M.; PÉREZ-GARCÍA, A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* towards *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 2007. vol. 118, p.323–327.

RUÍZ-GARCÍA, C.; BÉJAR, V.; MARTÍNEZ-CHECA, F.; LLAMAS, I.; QUESADA, E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, Southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005. vol. 55, p.191-195.

SAITOU, N & NEI, N. The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, 1987. v.4, p. 406-425.

SALMONI, P. S.; GERMANI, J. C.; VAN DER SAND, S. T. Estudo de produção de compostos com atividade antimicrobiana produzidos por *Streptomyces* sp. 1S. *Evidências*, 2012. vol. 12, n° 2, p. 175-186.

SANGER, F.; NICKELEN, S.; COULSON, A.R. DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA.* 1977, vol.74, n°12, p.5463-5467.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; da SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; dos SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa*

leaves extracts. *Journal of Ethno-Pharmacology*, 2005. vol. 97, p. 1-6.

SCHALLMEY, M., SINGH, A., WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal Microbiology*, 2004. vol. 50, p.11–17.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; BATISTA, C. R. V. Obtenção de um extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* e sua atividade antimicrobiana e hemolítica. *Alimento e Nutrição Araraquara*, 2005. vol.16, n°13, p.233-237.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS. K.; LI, W.; LOPES, R.; MCWILLIAN, H.; REMMERT, M.; SODING, J.; HIGGINS, D. G.; THOMPSON, J. D. Fast, scalable generation of high quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 2011. vol.7, n°1, p. 539-544.

SILVA, A. B.; BRITO, J. M. Controle Biológico de Insetos-Pragas e suas Perspectivas para o Futuro. *Revista Agropecuária Técnica,*2015. vol. 36, n°1, p. 248-258.

SILVA, L. J. da. Controle biológico de *Botrytis cinerea* em pós-colheita de morango (*Fragaria x ananassa*) por linhagem *Streptomyces araujoniae* sp. 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, 2013.

SILVA, M. B. T.; COSTA, M.M.M., GALHARDO, M. C. G.; VALLE, A. C. F.; MAGALHÃES, M. de A. F. M.; SABROZA, P. C.; OLIVEIRA, R. M. de. Esporotricose Urbana: Epidemia Negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2012. vol. 28, n° 10, p. 1867-1880.

SINCLAIR, J.B. 2003. Control ok seed-borne pathogens and diseases of soybean seeds and seedlings. *Pesticide Science*, vol. 37, p. 15-19.

SINDIVEG - Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Defesa Vegetal. Disponível em: http://sindiveg.org.br/balanco-2015-setor-de-agroquimicos-confirma-queda-de-vendas/. Acesso em: 04/12/2017

SLEPECKY, R. A. & HEMPHILL, H. E. The genus *Bacillus*-nonmedical. In: A BOLWS, H. G.; TRUPER, M.; DWORKIN, W.; HARDER AND SCHLEIFER, K. H. Ed(s). *The Prokaryoutes.* 1992, Springer-Verlag, New York. 2ª ed., p. 1687-1992.

SMITH, H.S. On some phases of insect control by the biological method. *Journal Economic Entomology* ,1909. vol.12 p.288–292.

SONG, B; RONG, Yan-Jun; ZHAO, MING-XIN; CHI, ZHEN-MING Antifungal activity of the lipopeptides produced by Bacillus amyloliquefaciens anti-CA against Candida albicans isolated from clinic. *Applied Microbiology Biotechnology,* 2013. vol. 97, p.7141–7150.

STAMP, N. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly Review of Biology*, 2003. vol. 71, p. 23-55.

STEHR, F. W. Parasitoids and predators in the pest management. In: METCALF. R. L.; LUCKMANN, W. H.

Ed(s). *Introduction to insect pest management*. New York: Wiley Interscience, 1975. p. 147-183.

SUPRAPTA, D. N. Pontencial of microbial antagonists as biocontrole agents plant fungal pathogens. *Journal International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, vol. 18, n° 2, p. 1-8, 2012.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M; HARPER, J. L. Fundamentos em Ecologia. 3ª ed. Porto Alegre, *Artmed Editora S.A.*, 2008. p. 197

TRABULSI, R.; ALTHERTUM, F. MICROBIOLOGIA. 4ª ed. São Paulo, *Atheneu*, 2005. p.718.

VALTER, j.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S. S.; Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry of lipopeptide bio-surfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied Environmental Microbiology*, 2002. vol.68, p. 6210-6219.

VAN DEN BOSH, R; MESSENGER, P.S.; GUITERREZ, A.P. An introduction to biological control, New York, *Plenum Press*, 1982. p. 247.

VAN DRIESCHE, R.G.; BELLOWS, T.S. JR. Biological control. New York, *Chapman and Hall*, 1996. p.539.

VIGERS, A.J., ROBERTS, W.K. and SELITRENNIKOFF, C.P. A new family of plant antifungal proteins. *Molecular Plan- Microbe Interactions Journal*,1991. n° 4, p. 315–323.

VINING, L. C. Secondary Metabolism. In: REHM, H. J.; REED, G. Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 volumes. *Weinhein: VCH*, 1986. vol. 4, p. 19-38.

WEI, Q.; LIAO, Y.; CHEN, Y.; WANG, S-H.; XU, Y.; TANG, L.; CHEN, F. Isolation, characterization and antifungal activity of β-1,3-glucanase from seeds of Jatropha curcas. *South African Journal of Botany*, 2005. vol. 71, n°1, p. 95-99.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991. vol. 173, n°2, p. 697-703.

WHITTAKER, R. H. Communities and ecosystems. Macmilllan – New York. 2ª ed. 1975

WILLIAMS, D. W. & LEPPLA, N. C. The future augmentation of beneficial arthropods. In: KAUFFMAN, W.C. & NECHOLS, J. R. (ED(s). *Selection criteria and ecological consequences of importing natural enemies*. Lanham, M.d. Proc. Thomas Say Publications in Entomology – Entomological Society of America.,1992, p. 87-102.

WILLIANS, D. H.; STONE, M. J.; HAUCK, P. R.; RAHMAN, S. K. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *Journal Natural Produtcs*. 1989, vol 52, p. 1189-1208.

WILSON, F.; HUFFAKER, C. B. The physiology, scope and importance of biological control, p. 3-14. In: Huffaker, C. B.; Messenger, P. S. (eds.). Theory and practice of biological control. New York, *Academic Press*, 1976. p. 788.

WISOTZJSEY, J.D.; JUNIOR, P.J.; FOX, G.E.; DEINHARD. G.; PORALLA, K. Comparative Sequence Analyses on the 16S rRNA(rDNA) of *Bacillus acidocaldarius, Bacillus acidoterrestris, and Bacillus cycloheptanicus* and Proposal for Creative of a New Genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1992, vol. 42, n°2, p. 263-269.

WOESE, C.R. & FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1977, vol. 74, n°11, p. 5088-5090.

WONG, J. H.; HAO, J.; CAO, Z.; QIAO, M.; XU, H.; BAI, Y.; NG, T. B. An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology*, 2008. vol. 105, p. 1888-1898.

WONG, J. H.; Ng, T. B. Studies on an Antifungal Protein and a Chromatographically and Structurally Related Protein Isolated from the Culture Broth of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Protein & Peptide Letters*, 2009, vol.16, p.1399-1406.

YE, Yun-feng.; LI, Qi-qin; G., F.; YUAN, Gao-qing; MIAO, Jian-hua; W., L. Identification of Antifungal Substance (Iturian A) Produced by *Bacillus subtillis* B47 and its Effect on Southern Corn Leaf Blight. *Journal of Integrative Agriculture*, 2012. vol. 11, n° 1, p. 90-99.

YUAN, B., WONG, J. H.; Ng, T. B. Studies on an Antifungal Protein and a Chromatographically and Structurally Related Protein Isolated from the Culture Broth of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Protein & Peptide Letters*, 2009. vol.16, p.1399-1406.

YULIAR. Influence of Palmitic Acid and Amino Acids Addition on Iturin A productivity by Bacillus *subtilis* RB14-CS. *Biodiversitas*, 2005. Vol. 6, n°. 3, p. 171-174.

ZOUARI, I.; JLAIEL, L.; TOUNSI, S.; TRIGUI, M. Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. *Biologycal Control.* 2016. vol.100, p.54-62.

APÊNDICE 1

Lista em ordem alfabética das espécies de *Bacillus* e números de acesso no GenBank das sequências usadas.

B. altitudinis. JQ320096
B. altitudinis. KT427442
B. amyloliquefaciens. AF489591
B. amyloliquefaciens. GQ280110
B. anthracis. GQ280034
B. anthracis. GQ280088
B. aryabhattai. KF010788
B. aryabhattai. KX231810
B. aryabhattai. MF537620
B. aryabhattai. MF537622
B. aryabhattai. MF537623
B. aryabhattai. MF537625
B. atrophaeus. AB021181
B. atrophaeus. NR. 024689
B. boroniphilus. EU660347
B. boroniphilus. FJ544338
B. carboniphilus. AB021182
B. carboniphilus. NR. 024690
B. cereus. AB334763
B. cereus. EU660318
B. cereus. FJ527559
B. cereus. FJ544331
B. cereus. FJ544349
B. cereus. FJ544356
B. cereus. FJ883017
B. circulans. KF010794
B. circulans. KR780377
B. firmus. DQ118015
B. firmus. EU660344
B. firmus. EU660357
B. flexus. AB021185
B. flexus. MF537618
B. flexus. NR. 024691
B. licheniformis. AY052767
B. licheniformis. DQ228696
B. licheniformis. EU162839
B. licheniformis. EU660343
B. licheniformis. JN013199
B. megaterium. AB334764
B. megaterium. DQ789400
B. megaterium. DQ973298
B. megaterium. FJ544328
B. megaterium. FJ544337
B. megaterium. FJ544394
B. megaterium. FJ544404
B. mojavensis. AB021191
B. mojavensis. KR780382
B. mojavensis. NR. 024693
B. mycoides. AB021192
B. mycoides. FJ544336
B. mycoides. KF010791
B. mycoides. NR. 036880
B. nealsonii. EU660368
B. nealsonii. FJ544393
B. nealsonii. KF010795
B. niabensis. HM631829
B. niabensis. HM631849
B. niacini. AB021194
*B. niacini. N*R. 024695
B. pseudalcaliphilus. NR. 026145
B. pseudalcaliphilus. X76449
B. pseudofirmus. KC581791
B. pseudofirmus. NR. 026139
B. pseudofirmus. X76439
B. pseudomycoides. FJ544335
B. pumilus. AB212862
B. pumilus. DQ209209
B. pumilus. EU219735
B. pumilus. EU239356
B. pumilus. EU287450
B. pumilus. EU596537
B. pumilus. EU660356
B. pumilus. EU660362
B. pumilus. EU660365
B. safensis. KF010796
B. siralis. AF071856
B. subtilis. AB016721
B. subtilis. AB269766
B. subtilis. AB305020
B. subtilis. AB501343
B. subtilis. AF198249
B. subtilis. AF199464
B. subtilis. JN013204
B. tequilensis. KX231808
B. thuringiensis. AF160221
B. thuringiensis. AM292029
B. thuringiensis. AM292033
B. thuringiensis. EF206345
B. thuringiensis. JF912900
B. thuringiensis. KF010790
B. thuringiensis. KF527200
B. thuringiensis. KT933210
B. thuringiensis. MF139049
B. vallismortis. AB021198
B. vallismortis. JF912890
B. vallismortis. KM084861
B. vallismortis. KM084863
B. vallismortis. NR. 024696
B. velezensis. KT036395
B. velezensis KT427440
B. weihenstephanensis AB021199
B. weihenstephanensis NR. 24697