



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA**  
**CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO**

**ISMAEL PINHEIRO LUCAS XAVIER**

**AVALIAÇÃO QUÍMICA DE *Bacillus spp* E *Azospirillum spp* COM APLICAÇÃO NA  
BANANICULTURA**

**FORTALEZA**

**2022**

ISMAEL PINHEIRO LUCAS XAVIER

AVALIAÇÃO QUÍMICA DE *Bacillus spp* E *Azospirillum spp* COM APLICAÇÃO NA  
BANANICULTURA

Monografia apresentada ao Curso de Química Bacharelado do Departamento de Química Analítica e Físico-Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Título de Bacharel em Química.

Orientadora Didática: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Davila Zampieri.

Orientador Profissional: Dr. Kirley Marques Canuto.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- X19a Xavier, Ismael Pinheiro Lucas.  
Avaliação química de *Bacillus* spp e *Azospirillum* spp com aplicação na bananicultura / Ismael Pinheiro Lucas Xavier. – 2022.  
121 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Profa. Dra. Davila Zampieri.  
Coorientação: Prof. Dr. Kirley Marques Canuto.
1. Metabólitos. 2. Lipopeptídeos. 3. Fungicinas. 4. UPLC/QDA. I. Título.

CDD 540

---

ISMAEL PINHEIRO LUCAS XAVIER

AVALIAÇÃO QUÍMICA DE *Bacillus spp* E *Azospirillum spp* COM APLICAÇÃO NA  
BANANICULTURA

Monografia apresentada ao Curso de Química  
Bacharelado do Departamento de Química  
Analítica e Físico-Química da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial à  
obtenção do Título de Bacharel em Química.

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Davila Zampieri (Orientador Didático-Pedagógico)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Kirley Marques Canuto (Orientador Profissional)  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA

---

Ms<sup>a</sup>. Auridéia Possidônio de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



*A Deus.*

*Aos meus pais – Glécio e Ana Carla – que me deram todo o amor e suporte necessário.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela força, iluminação e sabedoria concebida.

Aos meus pais, Glécio e Carla, que sempre me deram força, apoio e motivação para seguir minha caminhada como cientista desde pequeno.

À Prof.<sup>a</sup> Davila pelo seu suporte, acolhimento, dedicação e disponibilidade em me receber como seu orientando nessa jornada.

Ao pesquisador, Dr. Kirley, pela recepção, paciência e ensinamentos durante todas as etapas deste trabalho. O senhor realizou uma grande contribuição para meu crescimento profissional.

Aos analistas, alunos e estagiários do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais: Paulo, Lorena, Hilton, Tigressa, Priscila e Yasmin. Vocês tornaram a vivência desse trabalho mais humano e caloroso.

À Doutoranda Auridéia Possidônio pela imensa contribuição e direcionamentos nos meus trabalhos, desde a iniciação científica no Grupo de Bioinorgânica, até a participação da minha banca de TCC.

A Mestranda Juliana Sales por toda a amizade, compreensão e ensinamentos transmitidos durante toda minha iniciação científica. Obrigado pela preocupação e pelo apoio desde sempre.

A todos os meus colegas e amigos de profissão: Carla, Safira, Yana, Rodrigo, Pedro, Jadson, Stephanie, Milena, João Paulo, Ewerthon, Paulo Vitor, Sarah, Cassia, Giulia, Carlos, Augusto, Daniel, Emilly, Davi, Andressa, Vitória, Marquinhos, Ricardo, Karoline. Obrigado por todo o carinho e por tornarem todos esses anos de graduação uma fase mais leve e prazerosa.

Um agradecimento mais do que especial aos meus amigos Lucas, Caroline Braun, Mario, Mariana, Débora e Marlon. Acredito que nossa amizade se estenderá para além da graduação.

Ao meu companheiro João Victor, por todo o amor e carinho. Sou muito sortudo de ter você na minha vida.

Aos meus amigos Thauan, Maísa e Pedro pela amizade sincera, por todas as noites acordados juntos, pelas dificuldades compartilhadas e pela força que sempre podemos encontrar entre nós.

Aos meus amigos Rafael, Manuela, Ana Carolina, Emanuel e Isabela por terem se feitos presentes desde a escola, pelas risadas e pelos momentos de descontração.

Aos professores do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, especialmente o Prof. Jair Mafezoli e a Prof.<sup>a</sup> Alda Karine, por terem me aceitado em seus laboratórios e por terem me ensinado tudo que eu sei hoje em dia.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte do desenvolvimento deste trabalho.  
Meu mais sincero e profundo obrigado!

“Hoje, acredito que não saber é o que torna a vida possível.”

Lya Luft

## RESUMO

Bactérias do gênero *Bacillus* e *Azospirillum* são conhecidas por possuírem aplicações na agroindústria pela produção de substâncias bioativas que atuam no combate às pragas de lavouras, além de produção de ampla variedade de lipopeptídeos com função antifúngica. Nesse contexto, este trabalho tem por objetivo avaliar o perfil cromatográfico, a fim de identificar metabólitos secundários bioativos, além de lipopeptídeos, no caldo fermentativo livre de células das cepas de bactérias *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. stratosphericus*, *B. subtilis* e *Azospirillum brasilense*. Para isto, as amostras obtidas foram submetidas à partição líquido-líquido e precipitação ácida, posteriormente, à cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado com espectrômetro de massas e detector de arranjo de diodo (UPLC/QDA). As amostras também foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ). A investigação química resultou na identificação de 9 metabólitos, ciclo(D-Pro-D-Leu), ciclo(D-Trp-L-Pro), ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-D-Phe), fosfatidiletanolamina, 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoaxi-3H(4H)-ona, N-óxido de 2-nonil-4-hidroxiquinolina, lipoamida B, hidroxipalmitoil esfingalina, previamente reportados na literatura e na observação, a partir do modo de monitoramento de íons (SIM), de 6 picos nos cromatogramas referentes à Fengicinas A e B. A presença de fengicinas foi corroborada por RMN  $^1\text{H}$ . Evidenciando, a partir desses estudos, a presença de moléculas com propriedades antifúngicas nas cepas de interesse, com promissora aplicação mercado da bananicultura.

**Palavras-chave:** Metabólitos; Lipopeptídeos; Fengicinas; UPLC/QDA.

## ABSTRACT

Bacteria of the genus *Bacillus* and *Azospirillum* are well-known to have applications in the agroindustry for the production of bioactive substances that act in the combat against crop pests, in addition to the production of a wide variety of lipopeptides with antifungal function. In this context, this work aims to evaluate the chromatographic profile, in order to identify bioactive secondary metabolites, in addition lipopeptides, in the cell-free fermentation broth of strain *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. stratosphericus*, *B. subtilis*, and *Azospirillum brasilense*. For this, the sample obtained were subjected to liquid-liquid partition and acid precipitation, later, to ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometer and diode array detector (UPLC/QDA). The samples were also analyzed by <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The chemical investigation resulted in the identification of 9 metabolites, cyclic(D-Pro-D-Leu), cyclic(D-Trp-L-Pro), cyclic(L-Pro-L-Val), cyclic(L-Pro-D-Phe), phosphatidylethanolamine, 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxy-3H(4H)-one, 2-nonyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, lipoamide B, hydroxypalmitoyl sphinganine, previously reported in the literature and in the observation, from the ion monitoring mode (SIM), of 6 peaks in the chromatograms referring to fengycin A and B. The presence of fengycins was confirmed by <sup>1</sup>H NMR spectra. Evidencing, from these studies, the presence of molecules with antifungal properties in the strains, with promising application in the banana market.

**Keywords:** Metabolites; Lipopeptides; Fengycin; UPLC/QDA.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Classificação dos metabólitos secundários reportados para o gênero <i>Bacillus</i> .....	23
Figura 2	– Estrutura do bacileno .....	24
Figura 3	– Estruturas dos dicetopiperazinas e estilbenos identificados na espécie <i>Bacillus cereus</i> .....	26
Figura 4	– Estrutura do lipopeptídeo Kannurin .....	26
Figura 5	– Estrutura da surfactina e dos seus derivados identificados na espécie <i>Bacillus pumilus</i> .....	27
Figura 6	– Estrutura do ácido glicocólico, lipoamidas e derivados da amicoumicina ...	28
Figura 7	– Estrutura da Iturina A2 e Iturina A6 .....	28
Figura 8	– Metabólitos secundários bioativos identificados para a espécie <i>Bacillus stratosphericus</i> .....	29
Figura 9	– Dipeptídeos identificados para a espécie <i>Bacillus stratosphericus</i> .....	30
Figura 10	– Tripeptídeos e ciclopeptídeos identificados para a espécie <i>Bacillus stratosphericus</i> .....	30
Figura 11	– Outros metabólitos identificados para a espécie <i>Bacillus stratosphericus</i> ...	31
Figura 12	– Demais moléculas bioativas reportadas para a espécie <i>B. stratosphericus</i> ...	32
Figura 13	– Estrutura das iturinas relatadas para o <i>Bacillus subtilis</i> .....	33
Figura 14	– Estrutura das bacilomicinas identificadas para a espécie <i>Bacillus subtilis</i> ...	34
Figura 15	– Estrutura das fengicinas e plipastatinas identificadas na espécie <i>B. subtilis</i> ..	35
Figura 16	– Estruturas dos flavonóides, terpenóides e benzoxazinoide descritos para a espécie <i>Azospirillum brasilense</i> .....	38
Figura 17	– Estrutura simplificada de um espectrômetro de massas .....	41
Figura 18	– Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 501 ( <i>Bacillus subtilis</i> ) .....	48

Figura 19	– Espectros de massas e UV-vis dos picos característicos no extrato acetato de etila da amostra 501 ( <i>Bacillus subtilis</i> ) .....	49
Figura 20	– Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 502 ( <i>Azospirillum sp.</i> ) .....	55
Figura 21	– Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 503 ( <i>Azospirillum brasilense</i> ) .....	55
Figura 22	– Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 504 ( <i>Azospirillum brasilense</i> ) .....	56
Figura 23	– Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 505 ( <i>Bacillus stratosphericus/Bacillus pumillus</i> ) .....	56
Figura 24	– Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 506 ( <i>Bacillus cereus</i> ) .....	57
Figura 25	– Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 507 ( <i>Bacillus cereus</i> ) .....	57
Figura 26	– Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 508 ( <i>Bacillus safensis/Bacillus pumilus</i> ) .....	58
Figura 27	– Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 510 ( <i>Bacillus sp.</i> ) .....	58
Figura 28	– Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 511 ( <i>Bacillus sp.</i> ) .....	59
Figura 29	– Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 512 ( <i>Bacillus sp.</i> ) .....	59
Figura 30	– Perfil cromatográfico da Iturina A2 com $[M + H]^+ = 1043,5$ .....	61
Figura 31	– Perfil cromatográfico da Iturina A3-A5 com $[M + H]^+ = 1057,5$ .....	61
Figura 32	– Perfil cromatográfico da Iturina A6-A7 com $[M + H]^+ = 1071,5$ .....	62
Figura 33	– Perfil cromatográfico da Fengicina A com $[M + 2H]^{2+} = 718,3$ .....	62
Figura 34	– Perfil cromatográfico da Fengicina A com $[M + 2H]^{2+} = 725,4$ .....	63
Figura 35	– Perfil cromatográfico da Fengicina B com $[M + 2H]^{2+} = 739,4$ .....	63



Figura 36	– Perfil cromatográfico da Fengicina A com $[M + 2H]^{2+} = 732,4$ .....	64
Figura 37	– Perfil cromatográfico da Fengicina B com $[M + 2H]^{2+} = 746,4$ .....	64
Figura 38	– Perfil cromatográfico da Fengicina B com $[M + 2H]^{2+} = 753,4$ .....	65
Figura 39	– Perfil cromatográfico da Surfactina com $[M + H]^+ = 1008,4$ .....	65
Figura 40	– Estrutura química da Fengicina B .....	69
Figura 41	– Espectro de RMN de $^1H$ [600 MHz, $CD_3OD$ ] do ExtAcOEtNI .....	74
Figura 42	– Espectro de RMN de $^1H$ [600 MHz, $CD_3OD$ ] do ExtLPNI .....	74
Figura 43	– Espectro de RMN de $^1H$ [600 MHz, $CD_3OD$ ] do ExtAcOEt501 .....	75
Figura 44	– Espectro de RMN de $^1H$ [600 MHz, $CD_3OD$ ] do ExtLP501 .....	75
Figura 45	– Espectro de RMN de $^1H$ [600 MHz, $CD_3OD$ ] do ExtAcOEt510 .....	76
Figura 46	– Espectro de RMN de $^1H$ [600 MHz, $CD_3OD$ ] do ExtLP510 .....	76
Figura 47	– Expansão do espectro de RMN de $^1H$ [600 MHz, $CD_3OD$ ] do ExtLP510 ...	77
Figura 48	– Espectro de RMN de $^1H$ [600 MHz, $CD_3OD$ ] do ExtAcOEt512 .....	77
Figura 49	– Espectro de RMN de $^1H$ [600 MHz, $CD_3OD$ ] do ExtLP512 .....	78
Figura 50	– Expansão do espectro de RMN de $^1H$ [600 MHz, $CD_3OD$ ] do ExtLP512 ...	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das espécies, compostos e atividades biológicas descritas para o gênero <i>Bacillus</i> .....	36
Tabela 2 – Codificação e origem das amostras microbiológicas usadas .....	44
Tabela 3 – Massa dos extratos acetato de etila (ExtAcOEt) e lipopeptídeo (ExtLP) das cepas de <i>Bacillus</i> e <i>Azospirillum</i> .....	45
Tabela 4 – Rendimentos das extrações realizadas com cepas de <i>Bacillus</i> e <i>Azospirillum</i> .....	47
Tabela 5 – Dados dos espectros de massas obtidos no UPLC-QDA .....	51
Tabela 6 – Dados dos lipopeptídeos presentes nos extratos padrões .....	60
Tabela 7 – Dados obtidos pelo método SIM dos lipopeptídeos presentes nos Extratos Acetato de etila e Lipopeptídeo .....	66
Tabela 8 – Deslocamentos químicos dos resíduos de aminoácidos constituintes da Fengicina B nos extratos lipopeptídeo .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BOD</b>	Demanda Bioquímica de Oxigênio
<b>ESI</b>	Electrospray Ionization
<b>ExtAcOEt</b>	Extrato Acetato
<b>ExtLP</b>	Extrato Lipopeptídeo
<b><i>m/z</i></b>	massa/carga
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>SIM</b>	Selected Ion Monitoring
<b>UPLC</b>	Ultra-Performance Liquid Chromatography

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
<b>2.1</b>	<b>Cultivo de Bananeiras no Brasil</b> .....	21
<b>2.2</b>	<b>Considerações sobre o gênero <i>Bacillus</i></b> .....	22
2.2.1	Perfil químico do gênero <i>Bacillus</i> .....	23
2.2.2	Substâncias bioativas identificadas nas espécies <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus safensis</i> , <i>Bacillus stratosphericus</i> e <i>Bacillus subtilis</i> .....	25
<b>2.3</b>	<b>Considerações sobre o gênero <i>Azospirillum</i></b> .....	36
2.3.1	Perfil químico do gênero <i>Azospirillum</i> .....	37
2.3.2	Substâncias bioativas identificadas na espécie <i>Azospirillum brasilense</i> .....	37
<b>2.4</b>	<b>Lipopeptídeo</b> .....	38
2.4.1	Precipitação ácida de Lipopeptídeo .....	39
<b>2.5</b>	<b>Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i>, UPLC)</b> .....	39
<b>2.6</b>	<b>Espectrometria de massas</b> .....	40
<b>2.7</b>	<b>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b> .....	41
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	43
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	43
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	44
<b>4.1</b>	<b>Obtenção e preparo dos extratos acetato de etila e liporpotéico do caldo fermentativo das espécies <i>B. cereus</i>, <i>B. pumilus</i>, <i>B. safensis</i>, <i>B. stratosphericus</i>, <i>B. subtilis</i> e <i>A. brasilense</i></b> .....	44
<b>4.2</b>	<b>Análise do perfil cromatográfico por UPLC-QDA-MS</b> .....	45
<b>4.3</b>	<b>Análise por Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H</b> .....	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
<b>5.1</b>	<b>Extração líquido-líquido e precipitação ácida do caldo fermentativo</b> .....	47
<b>5.2</b>	<b>Determinação estrutural dos compostos majoritários no extrato acetato de etila por UPLC-QDA</b> .....	48

5.3	<b>Identificação dos lipopeptídeos presentes no extrato lipopeptídico pelo método SIM .....</b>	60
5.4	<b>Caracterização química dos lipopeptídeos majoritários nos extratos lipopeptídeos das amostras 501, 510 e 512 .....</b>	68
6	<b>CONCLUSÃO .....</b>	79
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	80
	<b>ANEXO A – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 502 .....</b>	90
	<b>ANEXO B – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 503 .....</b>	91
	<b>ANEXO C – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 504 .....</b>	93
	<b>ANEXO D – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 504 .....</b>	95
	<b>ANEXO E – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 506 .....</b>	97
	<b>ANEXO F – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 507 .....</b>	100
	<b>ANEXO G – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 508 .....</b>	101
	<b>ANEXO H – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 510 .....</b>	103
	<b>ANEXO I – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 511 .....</b>	104
	<b>ANEXO J – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 512 .....</b>	106
	<b>ANEXO K – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO ACETATO NÃO-INOCULADO .....</b>	108
	<b>ANEXO L – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO ACETATO 502 .....</b>	109
	<b>ANEXO M – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO ACETATO 503 .....</b>	110

<b>ANEXO N – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO ACETATO 504 .....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO O – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO ACETATO 505 .....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO P – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO ACETATO 506 .....</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO Q – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO ACETATO 507 .....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO R – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO ACETATO 508 .....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO S – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO ACETATO 510 .....</b>	<b>116</b>
<b>ANEXO T – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO ACETATO 511 .....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO U – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO ACETATO 512 .....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXO V – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO LIPOPEPTÍDEO NÃO-INOCULADO .....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO W – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO LIPOPEPTÍDEO 501 .....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO X – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO LIPOPEPTÍDEO 512 .....</b>	<b>122</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de agrotóxicos como recurso para o combate de pragas de lavouras tem se tornado, não apenas, uma questão de produtividade agrícola, mas, também, um problema de saúde pública e de preservação ambiental. Dessa forma, o uso de biomoléculas como alternativa para o controle de fitopatógenos e doenças de plantas mostra-se promissor, considerando-se que como essas substâncias não se acumulam no meio-ambiente, diminuem as chances de os patógenos adquirirem resistência e são menos agressivas para o ecossistema local e para a saúde humana. Algumas cepas de bactérias utilizadas na agricultura são capazes de produzir metabólitos que agem como substâncias promotores do crescimento de plantas e possuem ação antifúngica, como os lipopeptídeos produzidos pela espécie *Bacillus subtilis* (LANDY; WARREN; ROSENMAN, 1948; WALTON; WOODRUFF, 1949; RAUBITSCHKE; DOSTROVSKY, 1950).

A agricultura, responsável por 27,4% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro no ano de 2021 de acordo com o Cepea (centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada), apresentou o registro de 92 novos produtos no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) para o controle biológico a base de agentes microbiológicos e extratos vegetais, porém nenhum deles destinado ao cultivo de bananeiras. Apesar dos avanços significativos, o alto preço dos inseticidas biológicos agregado a onerosos processos de purificação é responsável pelo lento crescimento desse mercado. Os lipopeptídeos, classe de biomoléculas com conhecidas propriedades fitopatogênicas e baixa toxicidade ao ser humano, aliados a novas metodologias de obtenção são promissoras alternativas para impulsionar a comercialização de biomoléculas (DHANARAJAN; RANAGARAJAN; SEN, 2015; KAWAGOE *et al.*, 2015; PIEDRAHÍTA-AGUIRRE; ALEGRE, 2014; WANG *et al.*, 2015; YANÉZ-MENDIZÁBAL *et al.*, 2012).

A identificação e quantificação das isoformas e séries homólogas de lipopeptídeos, a partir do uso da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas do tipo quadrupolo com monitoramento de íons (UPLC/QDA-SIM), é uma atrativa técnica instrumental para o acompanhamento de diferentes produtos químicos de interesse em uma única corrida cromatográfica. Entretanto, tendo em vista as desvantagens recorrentes de técnicas cromatográficas, como o gasto de grandes volumes de solventes, o tratamento prévio das amostras por meio da partição líquido-líquido é uma alternativa viável para minimizar as limitações instrumentais (YANG *et al.*, 2015).

A análise das substâncias produzidas por algumas cepas de bactérias de uso recorrente na agricultura, especialmente do gênero *Bacillus* e *Azospirillum*, de forma a traçar o perfil de metabólitos secundários por meio de técnicas espectroscópicas, tais como UPLC-QDA e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ , é de grande importância à agricultura brasileira, a fim de se obter novas biomoléculas que possam substituir os defensivos químicos.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cultivo de Bananeira no Brasil

O Brasil é o quarto maior produtor de banana no mundo, sua produção foi estimada em cerca de 7 milhões de toneladas em uma área de 466 mil hectares, de acordo com o IBGE (2021). Apesar do seu enorme cultivo, a ocorrência de micro-organismos patogênicos nas lavouras e o elevado uso de adubação, devido à perda considerável de nutrientes pelas plantas, especialmente nitrogenados, fosfatados e potássicos, provocam uma acentuada queda de produtividade (BORGES *et al.*, 2022). Dentre as doenças que acometem cultivos de bananeiras, destacam-se aquelas provocadas por fungos fitopatogênicos, como a doença infecciosa fusariose, também conhecida por mal-do-panamá, provocada pelo fungo *Fusarium oxysporum*. Essa doença é responsável pela coloração marrom das folhas da bananeira e podridão dos seus frutos, assolando largas extensões de áreas cultivadas provocando consequentes prejuízos econômicos (PLOETZ, 2006).

Visando aumentar a produtividade agrícola por meio da melhoria do estado fitossanitário das plantas cultivadas, o uso indiscriminado de agrotóxicos para o controle de pragas e doenças de plantas tem causado problemas de saúde humana e animal, além da degradação de inúmeros ecossistemas (HUANG, 1997). De acordo com os dados fornecidos pelo Sindag (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola), o volume total de defensivos agrícolas aplicados no campo em 2020 totalizou 1.0933.070 L/ha, havendo um acréscimo de 8,1% desse volume no ano de 2021. Esses dados mostram a importância do controle de fitopatógenos no Brasil e a necessidade do desenvolvimento de alternativas de manejo. Porém, a falta de produtos de natureza biológica e o perfil conservador do agricultor brasileiro são os responsáveis pela lenta progressão do controle biológico no Brasil (D'AGOSTINO e MORANDI, 2009).

Não há no mercado brasileiro, segundo o Agrofit, banco de dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), nenhum ingrediente ativo microbiológico dentre os 10 produtos comerciais destinados ao cultivo de bananeiras (Agrofit, 2022. Disponível em [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons), consultado em 15/05/2022). Dessa forma, a ausência no mercado nacional de alternativas para o controle de doenças e melhorias do estado fitossanitário de culturas de bananeiras evidencia a necessidade de avanços em pesquisas para o desenvolvimento de substitutos aos pesticidas sintéticos.

## 2.2 Considerações sobre o gênero *Bacillus*

O gênero de bactérias *Bacillus* possui importante destaque biológico como promissores microrganismos, utilizados no controle contra fitopatógenos ou doenças de plantas. As espécies de *Bacillus* são uma das maiores fontes produtoras de compostos naturais bioativos, que são compostos de baixo peso molecular produzidos por mecanismos ribossomais ou não-ribossomais, exibindo uma ampla gama de atividades antibióticas, especialmente contra bactérias Gram Positivas (MING; EPPERSON, 2002). A quantidade de antibióticos produzidos por *Bacillus* soma aproximadamente 170 compostos, sendo 1/3 deles derivados do *B. subtilis* e os demais produzidos por outras espécies do gênero, dentre elas destacam-se *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa* e *B. pumilus* (AWAIS *et al.*, 2010).

Espécies de *Bacillus* possuem habilidades únicas de se replicarem rapidamente, resistência a condições adversas, capacidade de produção de endósporos duros, resistência a antibióticos e amplo espectro da capacidade de biocontrole (CAVAGLIERI; ORLANDO; ETCHEVERRY, 2005). Estudos *In vitro* demonstram a alta atividade do *Bacillus subtilis* contra fungos patogênicos em razão da sua elevada capacidade de produção não-ribossômica de variados tipos de lipopeptídeos incluindo iturinas, fengicinas, surfactinas e corinebactinas (STEIN, 2005; CAO *et al.*, 2012). Tem-se relatado um eficiente controle de fungos causadores de doenças em milho e sorgo através do uso da bactéria endofítica *B. subtilis*, principalmente contra *Acremonium striticum*, *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus* spp, *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* e *Colletotrichum sublineolum* (FIGUEIREDO *et al.*, 2010)

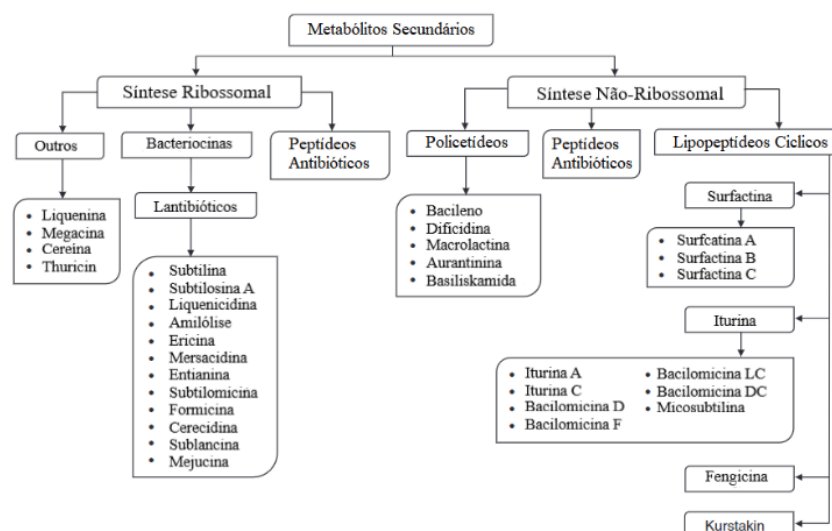
No Brasil, estudos feitos com plântulas de citros (AMORIM; MELO, 2002), pepino (MELO; VALARINI, 1995), alface (CORREA; BETTIOL, 2007) e trigo (LUZ, 1993) avaliaram as propriedades de algumas espécies de *Bacillus* como biocontroladores de fitopatógenos. Collins *et al.* (2003) observou em seus estudos que a disponibilidade de nutrientes no meio de cultura é determinante para o crescimento de colônia de bactérias, sendo mais efetivo, a utilização de um sistema de manejo integrado com fungicidas químicos em cultivos convencionais. Desse modo, produtos comerciais a base de *Bacillus*, em rotação com outros defensivos agrícolas, são alternativas menos onerosas para o controle de doenças em cultivos orgânicos (MAFFIA; MIZUBUTI, 2005).

### 2.2.1 Perfil químico do gênero *Bacillus*

A elucidação prática dos metabólitos microbianos, metaboloma, representa um complexo estudo envolvendo a aplicação de numerosas técnicas instrumentais, tais como Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), de forma independente ou acoplados a um sistema de Cromatografia Líquida ou Gasosa (LC ou GC) e Eletroforese Capilar (EC) (GARCIA *et al.*, 2008; HALKET *et al.*, 2005; MASHEGO *et al.*, 2007; SOGA *et al.*, 2003). A composição dos metabólitos de um organismo representa uma mistura dos produtos e intermediários dentro das rotas sintéticas que constituem seu metabolismo, resultando em adaptações no organismo para melhorar seu desempenho e crescimento no meio (PERES, 2004).

PEREZ-FONS *et al.* (2013), em seus experimentos separaram, isolaram e identificaram, por meio de técnicas cromatográficas, mais de 200 substâncias produzidas por 8 diferentes espécies de *Bacillus*, destacando-se dentre essas substâncias os açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, terpenos, ácidos graxos, nucleotídeos e compostos fenólicos. Esse gênero de bactérias possui também uma diversidade taxonômica que o torna alvo de interesse agroindustrial (HAMDACHE *et al.*, 2011). A classificação dos metabólitos secundários produzidos pelos *Bacillus*, baseado nas suas rotas sintéticas ribossomais e não-ribossomais (Figura 1), resume os compostos de interesse em 4 principais classes: lipopeptídeos cíclicos, peptídeos antibióticos, policetídeos e bacteriocinas.

**Figura 1** – Classificação dos metabólitos secundários reportados para o gênero *Bacillus*.

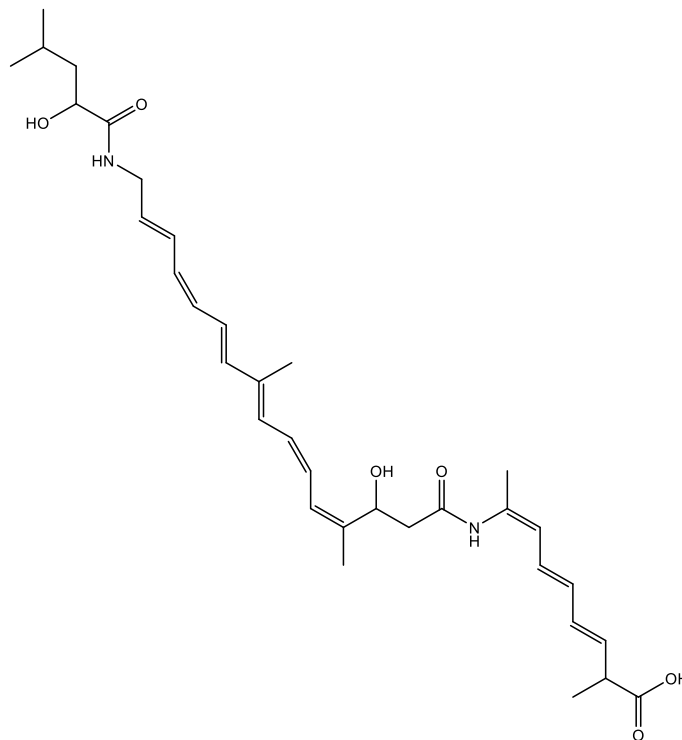


Fonte: (Horak *et al.*, 2019)

Das classes de metabólitos secundários conhecidos, os peptídeos antibióticos são os mais conhecidos e estudados em razão das suas aplicações medicinais. Além disso, policetídeos, lipopeptídeos e enzimas hidrolíticas diversas são observados e avaliados como moléculas com importante atividade biológica (ALETI; SESSITSCH; BRADER, 2015).

A rota biosintética não-ribossomal é responsável pela produção de uma variedade de metabólitos secundários e enzimas. Dentre os compostos produzidos nessa via, os lipopeptídeos se destacam por possuírem duas propriedades desejáveis: tolerância e seletividade. Isso os tornam apropriados para aplicações agrícolas, como agentes de biocontrole e fertilizantes (MONGKOLTHANARUK, 2012). Também são conhecidos os policetídeos, uma larga classe de substâncias com estruturas diversas que exibem propriedades farmacológicas (MONDOL; SHIN; ISLAM, 2013; PALAZZINI *et al.*, 2016). Um conhecido policetídeo produzido pelas espécies de *Bacillus* é o bacileno (Figura 2), um antibiótico poliênico responsável pela inibição da síntese protéica em organismos procariontes que possui uma estrutura linear composta por ligação entre amidas (HAMDACHE *et al.*, 2011).

**Figura 2** – Estrutura do bacileno.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

As bacteriocinas é uma classe de metabólitos produzido por mais de 99% das bactérias, sintetizado através da rota ribossomal (TYC *et al.*, 2017). *Bacillus* sp. produzem uma

variedade de bacteriocinas incluindo subtilina, ericina, coagulina, sublancina, mersacidina, turincina, cereína, megacina e liquenina (ABRIOUEL *et al.*, 2011). Já as enzimas hidrolíticas, representadas pela lipase, protease e quitinase, são uma classe de metabólitos rigorosamente estudados devido a sua abundância natural como biopolímero e suas propriedades biológicas reportadas (SHARMA *et al.*, 2018; LEE; KIM, 2015; CHANDRASEKARAN *et al.*, 2014; ZANG *et al.*, 2014).

### 2.2.2 Substâncias bioativas identificadas nas espécies *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus stratosphericus* e *Bacillus subtilis*

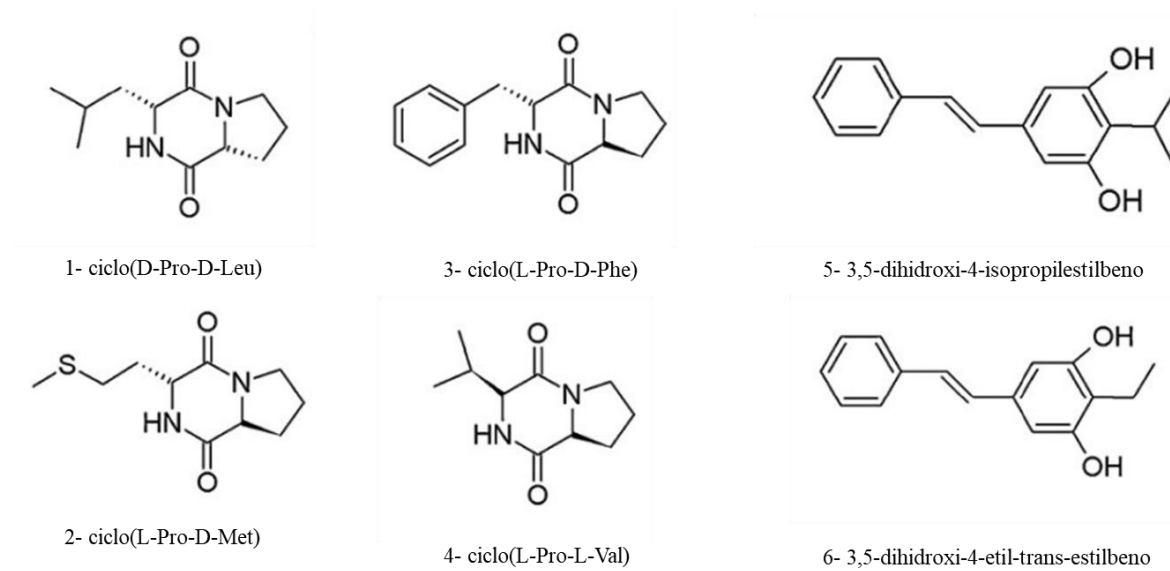
Para a espécie *Bacillus cereus*, os metabólitos secundários descritos com atividades biológicas promissoras são pertencentes às classes de dicetopiperazinas e estilbenos (KUMAR *et al.*, 2013).

Dentre as dicetopiperazinas encontradas em maiores concentrações estão, ciclo(D-Pro-D-Leu) (1), ciclo(L-Pro-D-Met) (2), ciclo(L-Pro-D-Phe) (3) e ciclo(L-Pro-L-Val) (4). Com relação aos estilbenos cita-se, 3,5-dihidroxi-4-isopropilestilbeno (5) e 3,5-dihidroxi-4-etil-trans-estilbeno (6) (KUMAR *et al.*, 2013). As estruturas das substâncias descritas acima são mostradas na Figura 3 (pg. 26).

Ajesh *et al* (2013) descreveram pela primeira vez na literatura a caracterização e estudos das propriedades antifúngicas de um novo lipopeptídeo isolado a partir de *B. cereus*. Identificado como kannurin (Figura 4), esse lipopeptídeo pertencente a classe das surfactinas apresenta uma cadeia heptapeptídica cíclica composta pela sequência de aminoácidos Leu-Asp-Val-Leu-Leu-Leu-Leu.

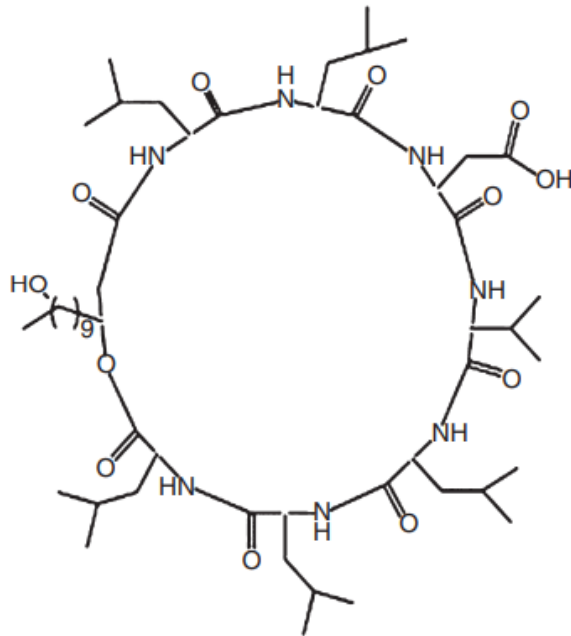
Tem-se reportado também a produção de zwittermicin A por *B. cereus*, um antibiótico aminopoliol muito eficiente contra micro-organismos patogênicos de plantas, tais como *Phytophthora medicaginis* que causa morte das raízes de alfafa e grão de bico (STABB *et al.*, 1994). Embora muitos estudos atestem os efeitos antibióticos de metabólitos secundários do *B. cereus* contra vários organismos patógenos de plantas, os mecanismos de inibição ainda são pouco conhecidos.

**Figura 3** - Estruturas dos dicetopiperazinas e estilbenos identificados na espécie *Bacillus cereus*.



**Fonte:** Adaptado de KUMAR *et al.* (2013).

**Figura 4** – Estrutura química do lipopeptídeo Kannurin.

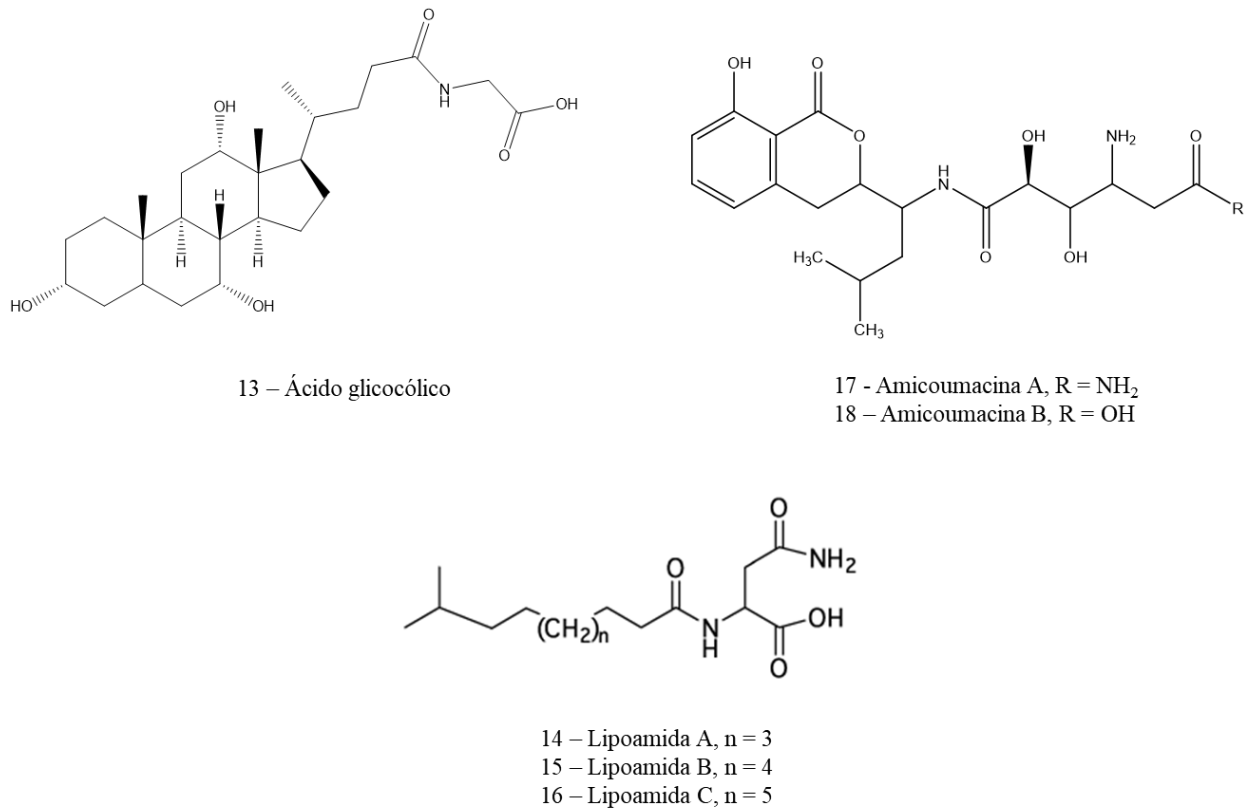


**Fonte:** AJESH *et al.* (2013)

Para a espécie *Bacillus pumilus*, são relatados lipopeptídeos cíclicos análogos da surfactina (7) que apresentam um fragmento de heptapeptídeo ligado a uma cadeia lateral de ácido contendo entre 13 e 16 átomos de carbono. Na Figura 5 encontra-se a estrutura da surfactina e dos seus análogos identificados (BERRUE *et al.*, 2009).



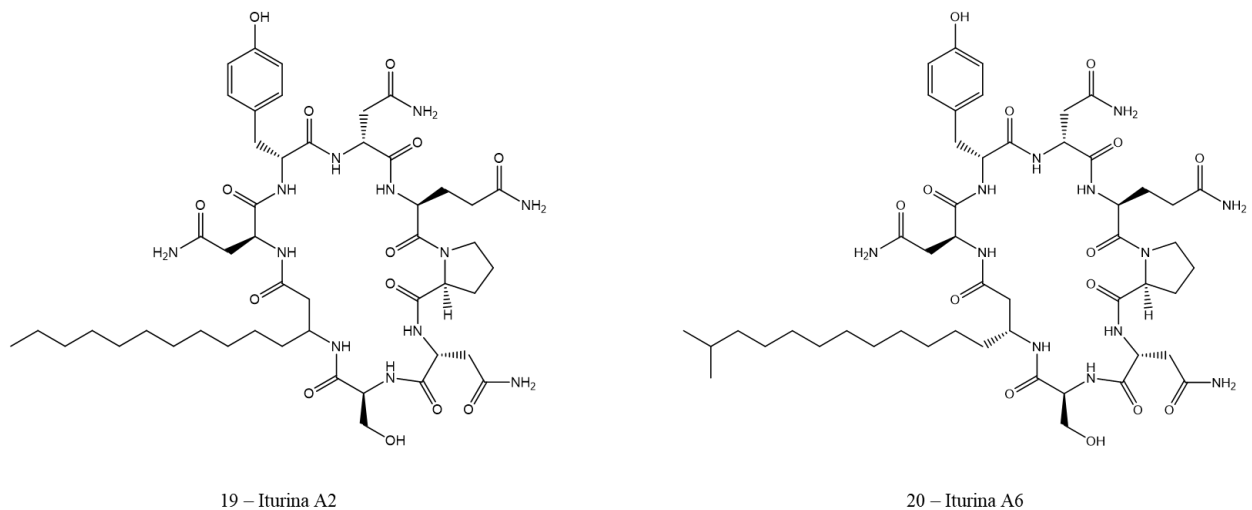
**Figura 6** – Estrutura do ácido glicocólico, lipoamidas e derivados da amicoumacina.



**Fonte:** Adaptado de BERRUE *et al* (2009).

Para a espécie *Bacillus safensis*, é relatada a presença de dois lipopeptídeos antifúngicos de interesse agrícola, Iturina A2 (19) e Iturina A6 (20) (RONG *et al.*, 2020). As estruturas dos compostos citados encontram-se na Figura 7.

**Figura 7** – Estrutura da Iturina A2 e Iturina A6.

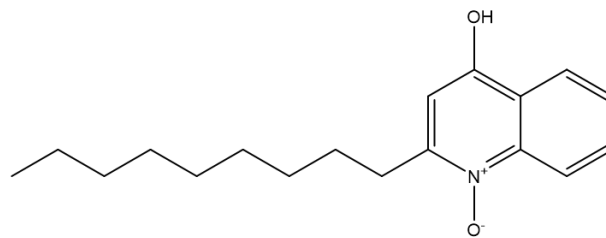


**Fonte:** Elaborado pelo autor.

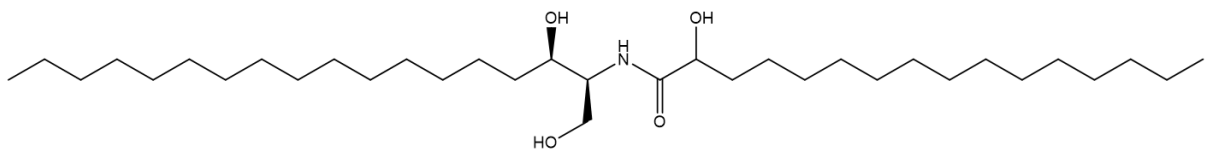


Para a espécie *Bacillus stratosphericus*, os metabólitos secundários identificados como compostos bioativos incluem N-óxido de 2-nonil-4-hidroxiquinolina (21), ceramidas de esfingosina como hidroxipalmitoil esfinganina (22), n-palmitoil esfinganina (23) e cer(d18:1/0:0) (24), dipeptídeos como His-Pro (25), Ile-Gly (26), Ile-Pro (27) Leu-His (28), Leu-Phe (29), Leu-Pro (30) e Val-Asp (31), tripeptídeo Phe-Ile-Lys (32), ciclopeptídeos como ciclo(D-Trp-L-Pro) (33) e ciclo(L-Phe-L-Pro) (34), desidroabietilamina (35), 2-araquidonoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (36), fosfatidiletanolamina (37), ácido 3-hidroxihexadecanóico (38), 7alfa, 27-dihidroxicolesterol (39), N-acetil-D-manosamina (40), ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-hidroxiopropanóico (41), ácido fitânico (42) e 2-Undecil-4(1H)-quinolinona (43) (KHAN *et al.*, 2020). As substâncias descritas acima estão ilustradas na Figura 8.

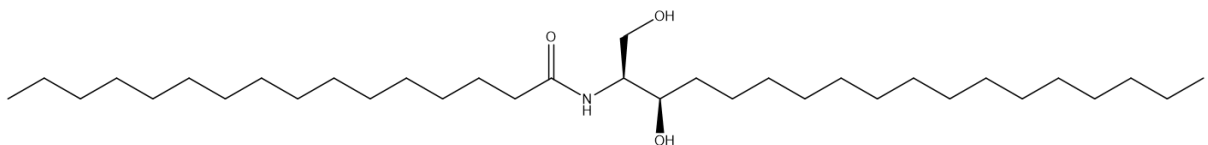
**Figura 8** – Metabólitos secundários bioativos identificados para a espécie *Bacillus stratosphericus*.



21 - N-óxido de 2-nonil-4-hidroxiquinolina



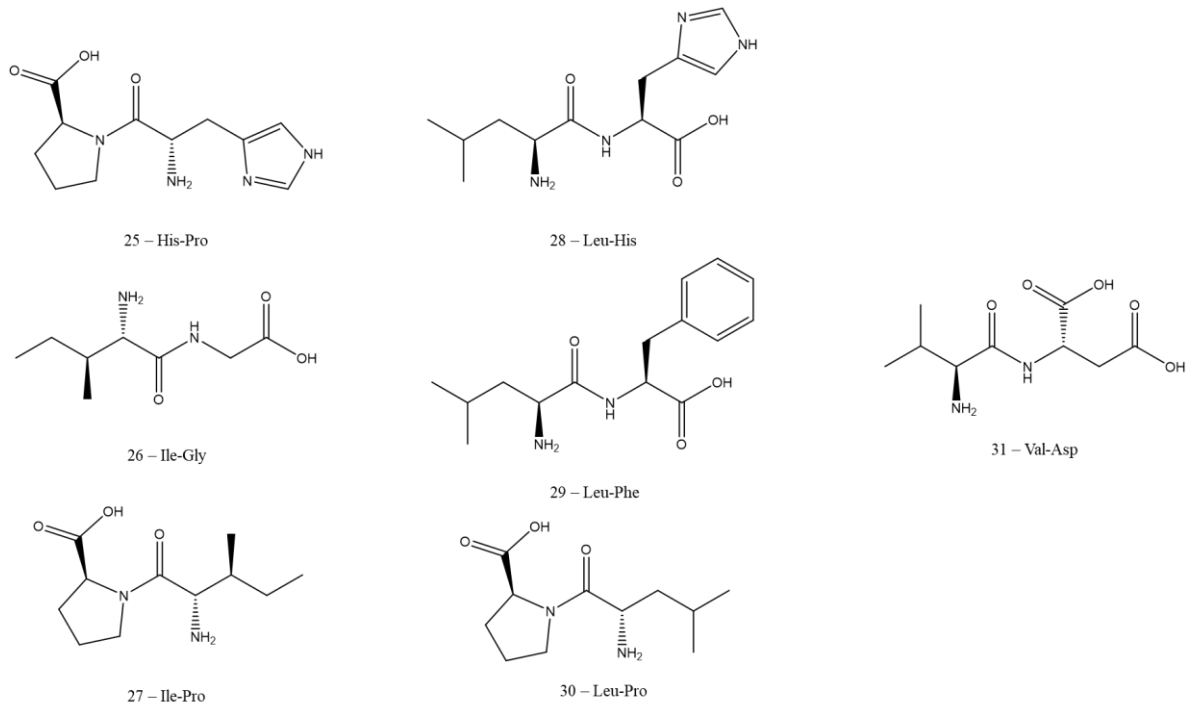
22 – Hidroxipalmitoil esfinganina



23 – N-palmitoil esfinganina

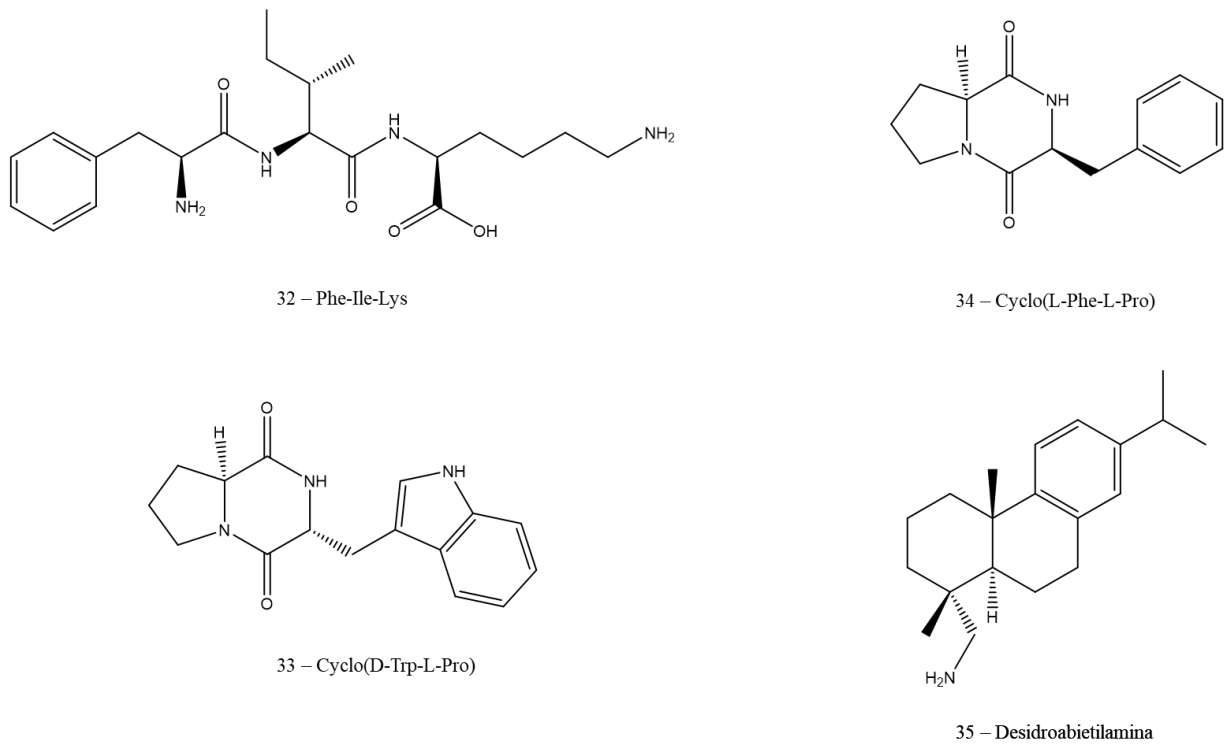
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 9** – Dipeptídeos identificados para a espécie *Bacillus stratosphericus*.



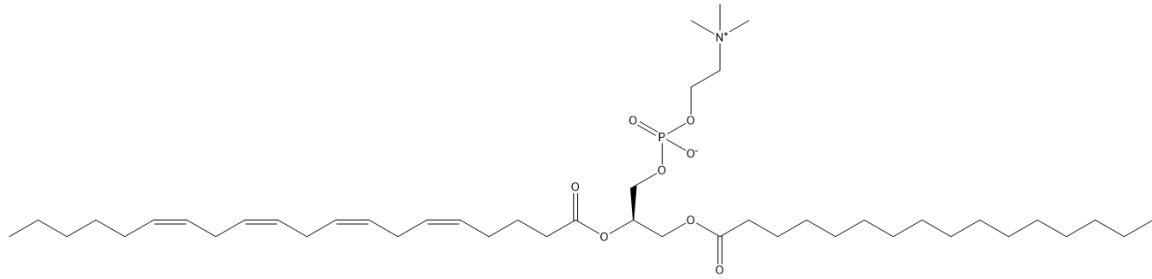
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 10** – Tripeptídeos e ciclopeptídeos identificados para a espécie *Bacillus stratosphericus*.

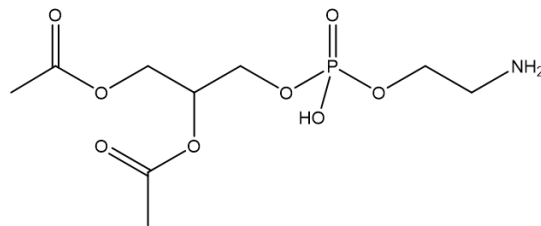


**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 11** – Outros metabólitos identificados para a espécie *Bacillus stratosphericus*.



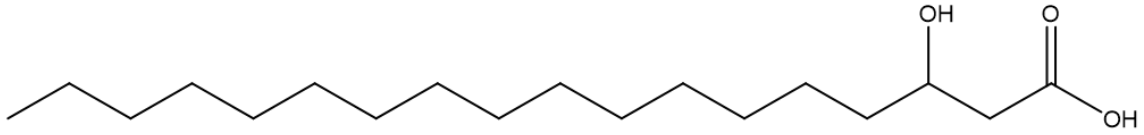
36 – 2-araquidonoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina



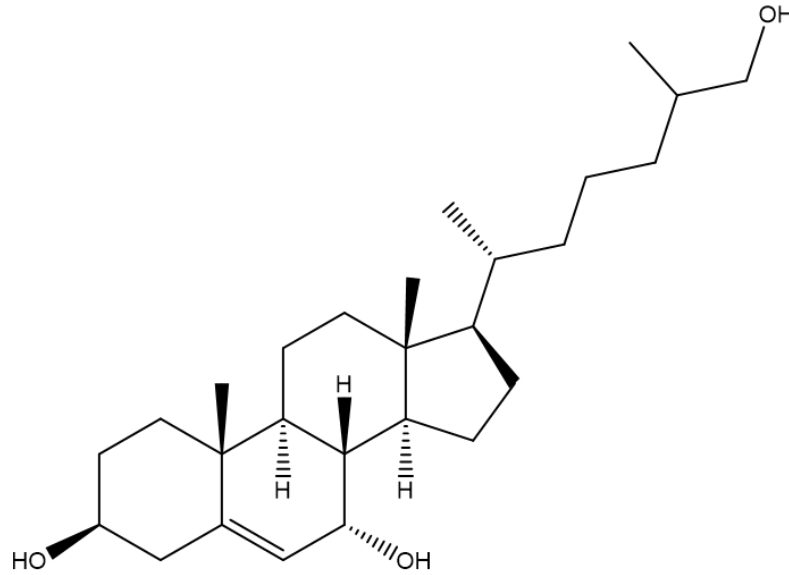
37 – fosfatidiletanolamina

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

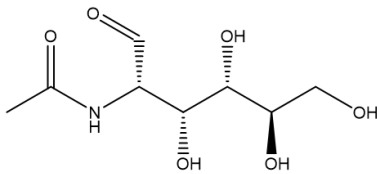
**Figura 12** – Demais moléculas bioativas reportadas para a espécie *B. stratosphericus*.



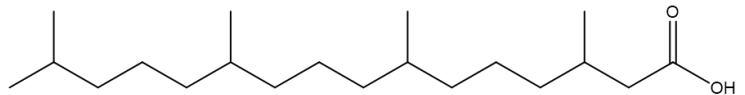
38 – ácido 3-hidroxihexadecanóico



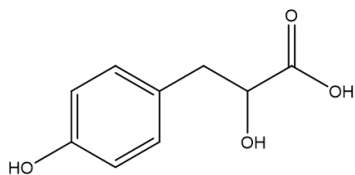
39 – 7alfa, 27-dihidroxicolesterol



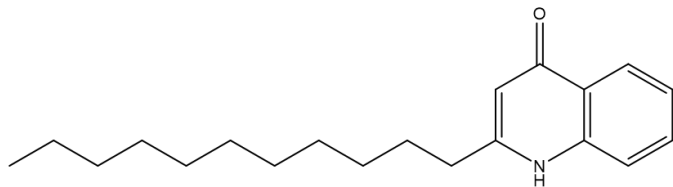
40 – N-acetil-D-manosamina



42 – ácido fitânico



41 – ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-hidroxiopropanóico

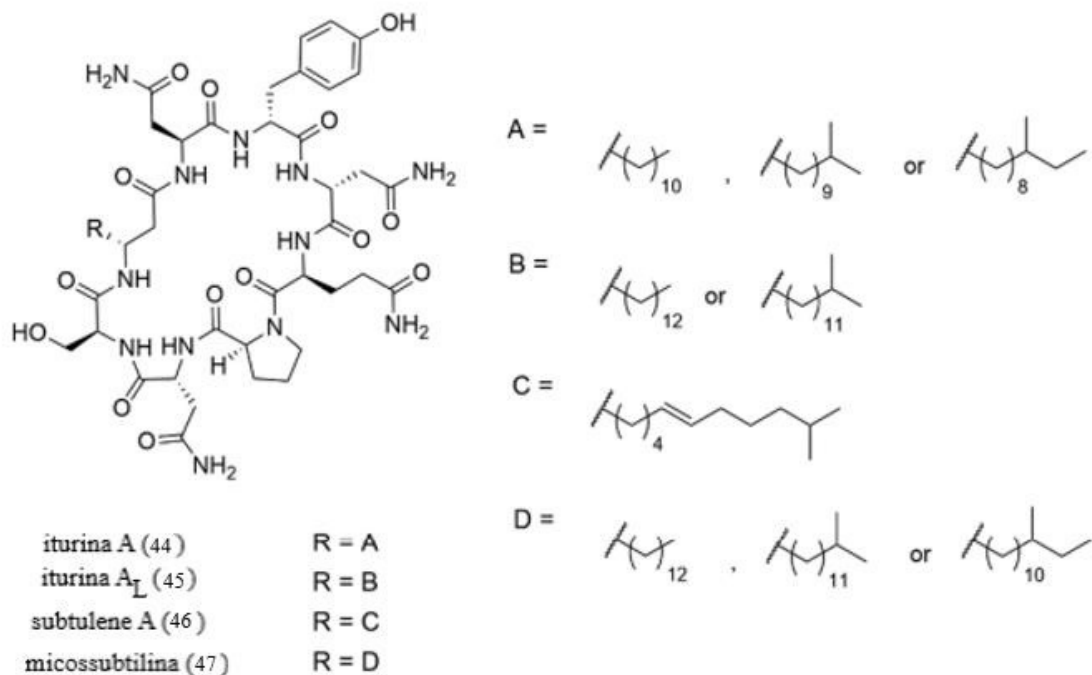


43 – 2-undecil-4(1H)-quinolinona

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

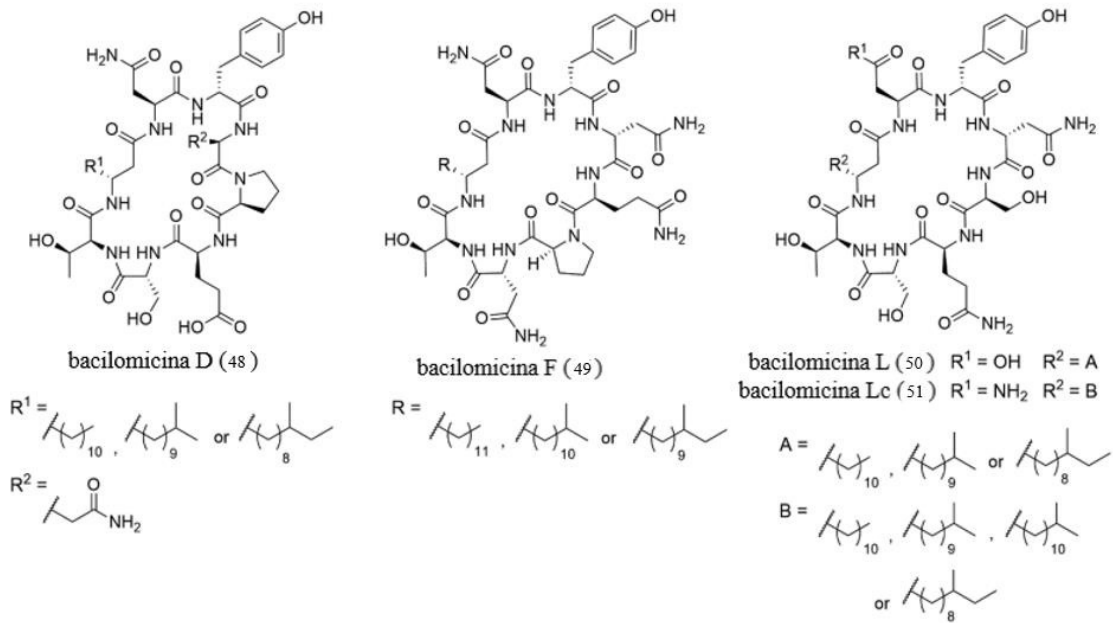
Para a espécie *Bacillus subtilis*, os metabólitos bioativos com potencial para biocontrole de patógenos de plantas são os lipopeptídeos cíclicos, genericamente, pertencentes às famílias das surfactinas, iturinas e fengicinas (LANDY; WARREN; ROSENMAN, 1948; WALTON; WOODRUFF, 1949; RAUBITSCHKE; DOSTROVSKY, 1950). Para os compostos da família das iturinas, tem-se iturina A (44), iturina A<sub>L</sub> (45), subtulene A (46), micossutilina (47), bacilomicina D (48), F (49), L (50) e L<sub>c</sub> (51) (DELCAMBE, 1965; WINKELMANM *et al.*, 1983; THASANA *et al.*, 2010; WALTON; WOOFRUFF, 1949; MHAMMEDI *et al.*, 1982; BESSON *et al.*, 1978; ESHITA *et al.*, 1995). As estruturas das iturinas descritas acima encontram-se na Figura 13 e 14 (p. 27).

**Figura 13** – Estruturas químicas das iturinas relacionadas para o *Bacillus subtilis*



**Fonte:** Adaptado de KASPAR *et al.* (2019)

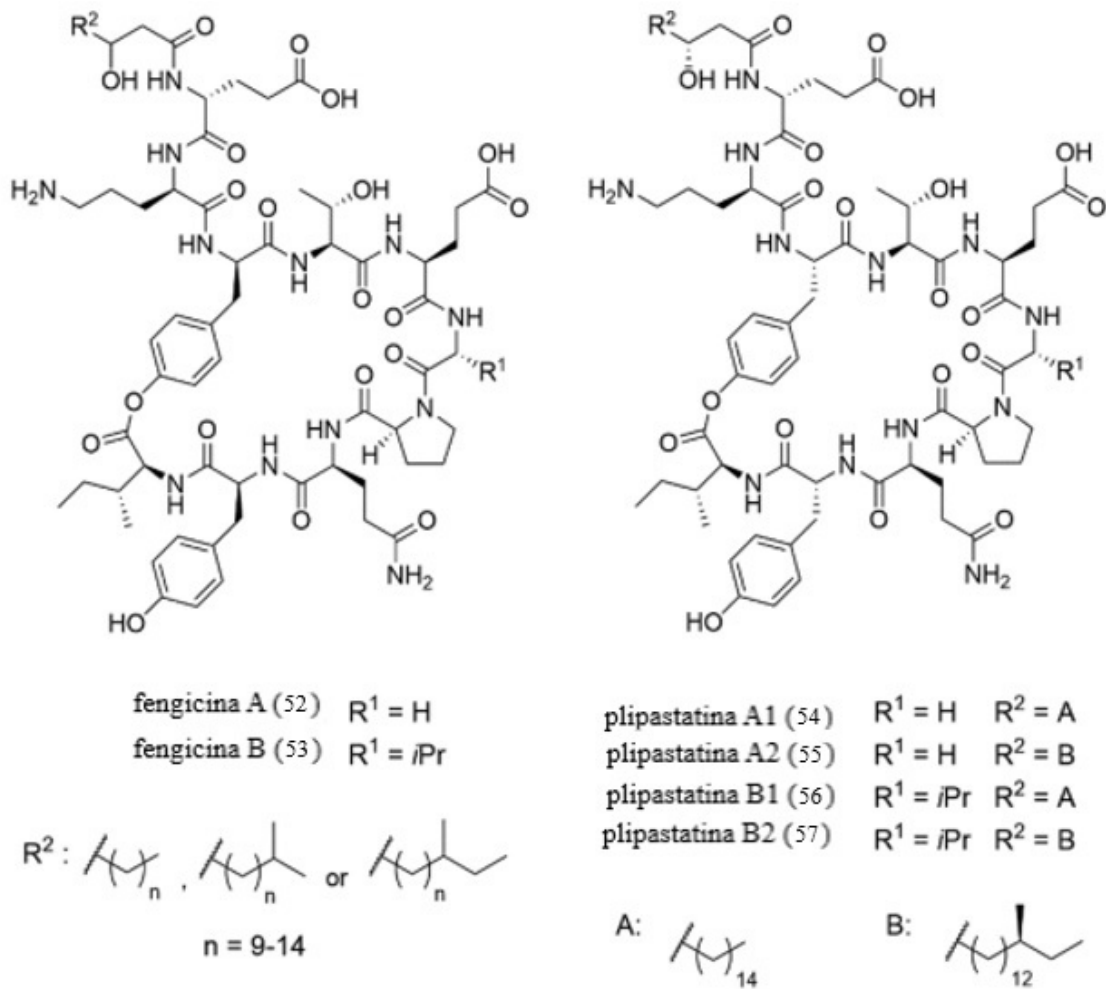
**Figura 14** – Estrutura das bacilomicinas identificadas para a espécie *Bacillus subtilis*.



**Fonte:** Adaptado de KASPAR *et al.* (2019)

Dentre as fengicinas podemos citar a fengicina A (52) e B (53), plipastatinas A1 (54), A2 (55), B1 (56) e B2 (57) (VANITTANAKOM *et al.*, 1986; UMEZAWA *et al.*, 1986). Da família das surfactinas, a única molécula bioativa identificada e isolada a partir da cepa *Bacillus subtilis* é a surfactina (7) (ARIMA *et al.*, 1968), ilustrada na Figura 15.

**Figura 15** – Estrutura das fengicinas e plipastatinas identificadas na espécie *B. subtilis*.



**Fonte:** Adaptado de KASPAR *et al.* (2019)

A Tabela 1 resume os compostos bioativos relatados para cada espécie de *Bacillus* e sua respectiva atividade biológica.

**Tabela 1** – Resumo das espécies, compostos e atividades biológicas descritas para o gênero *Bacillus*.

<b>Espécie</b>	<b>Compostos</b>	<b>Atividade Biológica</b>
<b><i>B. cereus</i></b>	ciclo(D-Pro-D-Leu); ciclo(L-Pro-D-Met); ciclo(L-Pro-D-Phe); ciclo(L-Pro-L-Val)	Antifúngica e citotóxica
	3,5-dihidroxi-4-etil-trans-estilbeno; 3,5-dihidroxi-4-isopropilestilbeno	Alelopática
	kannurin	Antifúngica
	zwittermicin A	Antibiótica
<b><i>B. pumilus</i></b>	surfactina e análogos	Antibiótica
	ácido glicólico, lipoamidas e amicoumicinas	Antioxidante e antimicrobiana
<b><i>B. safensis</i></b>	Iturina A2 e Iturina A6	Antibiótica
<b><i>B. stratosphericus</i></b>	N-óxido de 2-nonil-4-hidroxiquinolina; ceramidas de esfingosina; dipeptídeos; tripeptídeos	Antifúngica e antibiótica
	ciclopeptídeos; desidroabietilamina	
	2-araquidonoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfolina	
	fosfatidiletanolamina; ácido 3-hidroxi-hexadecanóico; 7 $\alpha$ , 27-dihidroxicolesterol; N-acetil-D-manosamina	
	ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-hidroxi-propanóico; ácido fitânico e 2-Undecil-4(1H)-quinolinona	
<b><i>B. subtilis</i></b>	Surfactinas, iturinas e fengicinas	Antibiótica

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 2.3 Considerações sobre o gênero *Azospirillum*

Descoberto em 1925 por Martinus Beijerinck, na Holanda, o gênero *Azospirillum* é conhecido por ser um grupo bacteriano Gram-negativo, microaerofílico, não fermentativo e fixador de nitrogênio (CASSÁN *et al.*, 2020). Esse gênero apresenta duas características principais: a habilidade de fixar nitrogênio atmosférico (DAY; DOBEREINER, 1976) e a capacidade de produzir vários fitohormônios, incluindo auxinas, citocininas e giberelinas (REYNDERS; VLASSAK, 1979; TIEN *et al.*, 1979). Dessa forma, as espécies do gênero *Azospirillum* são consideradas bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) mais promissoras de todo o mundo, sendo comercializadas em vários países da América do Sul, incluindo Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994; CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016).



Pertencentes à família *Rhodospirillaceae*, as espécies *Azospirillum* são alfa-proteobactérias isoladas, principalmente, do solo (BALDANI *et al.*, 2005). Entretanto este gênero é bastante versátil uma vez que pode ser isolado de diferentes ambientes, sendo resistente à condições extremas, como solo salino, solo contaminado por óleo, produtos fermentados, fontes de sulfeto e tanques de fermentação (REIS *et al.*, 2015; ANANDHAM *et al.*, 2019; TIKHONOVA *et al.*, 2019).

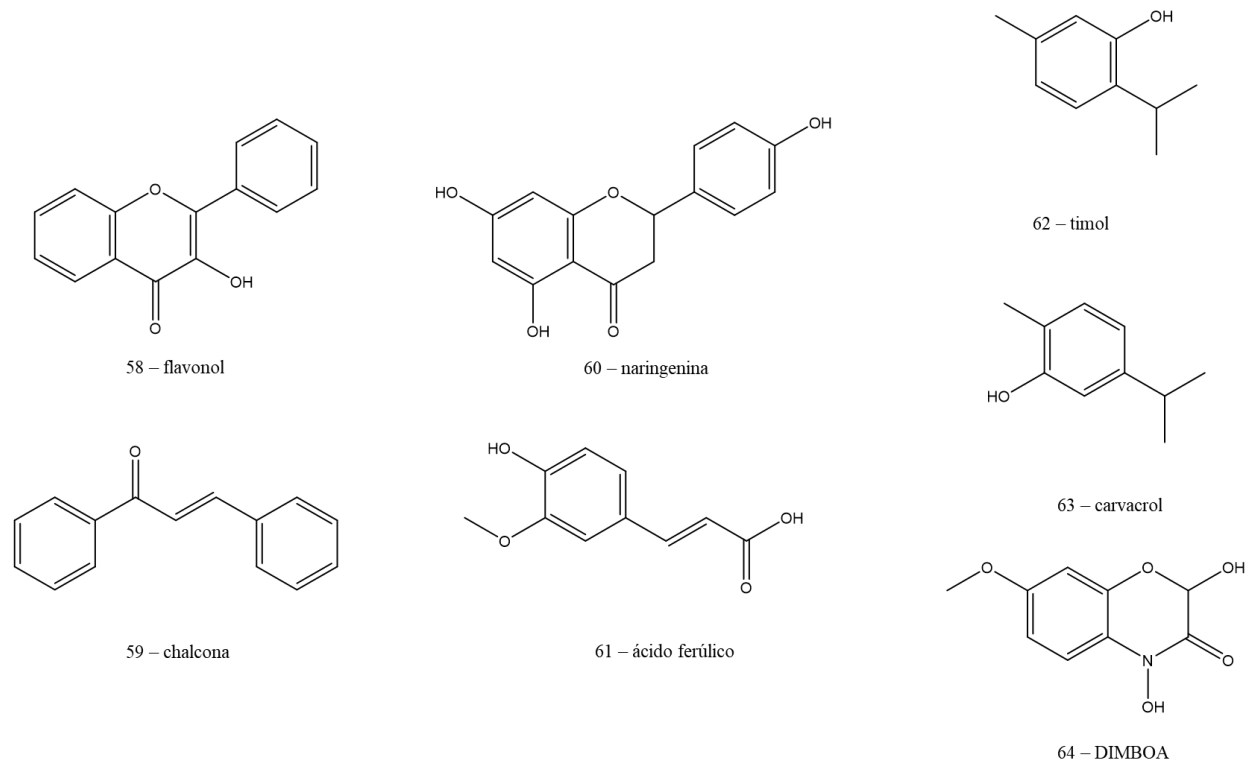
### 2.3.1 Perfil químico do gênero *Azospirillum*

As classes de metabólitos secundários reportados para o gênero *Azospirillum*, que possuem associação com a melhoria de processos agrícolas através da promoção do crescimento de plantas e toxicidade contra micro-organismos patogênicos, são, em sua maioria, compostos fenólicos (flavonoides) derivados do ácido salicílico (THOMAS *et al.*, 2019), terpenos e alcalóides (KORENBLUM; AHARONI, 2019).

### 2.3.2 Substâncias bioativas identificadas na espécie *Azospirillum brasilense*

As substâncias descritas para a espécie *Azospirillum brasilense*, com maior frequência e com atividade biológica comprovada, pertencentes à classe de flavonóides são, flavonol (58), chalcona (59), naringenina (60) (THOMAS *et al.*, 2019) e ácido ferúlico (61) (MISHRA *et al.*, 2006). Dentre os terpenóides são relatados, timol (62) e carvacrol (63) (BANCHIO *et al.*, 2010). Também é citado a produção do benzoxazinoide descrito por 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoaxi-3H(4H)-ona (DIMBOA) (64) (AHMAD *et al.*, 2011). Todas as estruturas apresentadas estão ilustradas na Figura 16.

**Figura 16-** Estruturas dos flavonóides, terpenóides e benzoxazinoide descritos para a espécie *Azospirillum brasilense*.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

## 2.4 Lipopeptídeos

Os lipopeptídeos são uma classe de surfactantes que apresentam como estrutura básica uma cadeia cíclica de peptídeos ligada a ácidos graxos que podem variar quanto ao seu tamanho. Existem três famílias principais de lipopeptídeos: iturina, fengicina e surfactina (DHANARAJAN; RANAGARAJAN; SEN, 2015; JACQUES, 2011). O comprimento da cadeia de ácidos graxos pode variar de C<sub>14</sub> a C<sub>17</sub> para iturinas, de C<sub>14</sub> a C<sub>18</sub> para fengicinas e de C<sub>13</sub> a C<sub>16</sub> no caso das surfactinas. Essas famílias apresentam ainda subdivisões que dependem do número de átomos de carbonos da porção peptídica, determinando sua isoforma, e do número de átomos de carbono da porção lipídica, determinando sua série homóloga. (JACQUES, 2011).

Os compostos lipopeptídicos são caracterizados por apresentarem elevada eficiência contra fungos fitopatogênicos em detrimento dos pesticidas comerciais, além de apresentarem ação antibiótica, baixa toxicidade e baixo efeito alérgico em humanos e animais (DHANARAJAN; RANAGARAJAN; SEN, 2015; KAWAGOE *et al.*, 2015; PIEDRAHÍTA-AGUIRRE; ALEGRE, 2014; WANG *et al.*, 2015; YANÉZ-MENDIZÁBAL *et al.*, 2012).

É comprovado, a partir de estudos realizados *in vitro* e *in vivo* por Dey *et al.* (2015), que os lipopeptídeos pertencentes a família da iturina, especialmente a iturina A, possuem significativa atividade no combate ao câncer de mama. A família das fengicinas possuem ação antifúngica, inibindo especialmente fungos filamentosos, sendo um excelente agente para tratar topicamente dermatomicoses (EEMAN *et al.*, 2014). A surfactina, por sua vez, atua como agente antiviral e inibidor de toxinas, sendo um potencial agente inibitório de inflamações crônicas de lesões ateroscleróticas (GAN *et al.*, 2016; MEENA; KANWAR, 2015; PARK *et al.*, 2013; SANTOS DA SILVA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2014).

#### 2.4.1 Precipitação ácida de Lipopeptídeos

A extração de lipopeptídeos é uma importante etapa a ser analisada para reduzir os custos da obtenção dessas biomoléculas. O desenvolvimento de tecnologias que diminuíssem o número de operações unitárias requeridas para a purificação de moléculas de interesse para a indústria biotecnológica é essencial, uma vez que, os processos adotados podem comprometer em até 80% o custo fabril do bioproduto (BALASUNDARAM; HARRISON, 2008).

O método mais conhecido da literatura envolvendo a purificação de baixa resolução de lipopeptídeos é a precipitação ácida do caldo fermentativo livre de células e sedimentos. Esse método consiste na redução do pH do caldo fermentado até um valor de, aproximadamente, 2 através de uma solução de HCl 6,0 M (PATHAK *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2015). Após o descanso de 24 horas, a amostra acidificada é centrifugada, o sobrenadante é descartado e o precipitado é solubilizado em um solvente orgânico, mais comumente metanol, etanol ou solução alcalina (NaOH) (PATHAK *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2015).

Apesar de ser um método lento, em razão do tempo necessário para que ocorra a precipitação dos lipopeptídeos, e necessitar de outras operações para melhorar a pureza das biomoléculas, é um método simples para obtenção de lipopeptídeos bruto (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 2001).

## 2.5 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (*Ultra-Performance Liquid Chromatography*, UPLC)

As técnicas cromatográficas são métodos fundamentados na separação de misturas, no qual os componentes da mistura são distribuídos entre duas fases: estacionária e móvel. Esses métodos são amplamente utilizados para identificação, separação e quantificação de

compostos bioativos. O UPLC é uma técnica cromatográfica, geralmente acoplada a um sistema de espectrometria de massas (UPLC-MS) (PEREZ *et al.*, 2004), que promove uma melhor resolução do cromatograma quando comparado com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*). O equipamento opera com um diâmetro das partículas cromatográficas de 2  $\mu\text{m}$  em um sistema que pode atingir pressões entre 6.000 e 15.000 psi, sendo esses fatores determinante para melhora da razão sinal/ruído e da largura dos picos, permitindo a detecção de um número maior de metabólitos em comparação com o HPLC (ZHAO *et al.*, 2014).

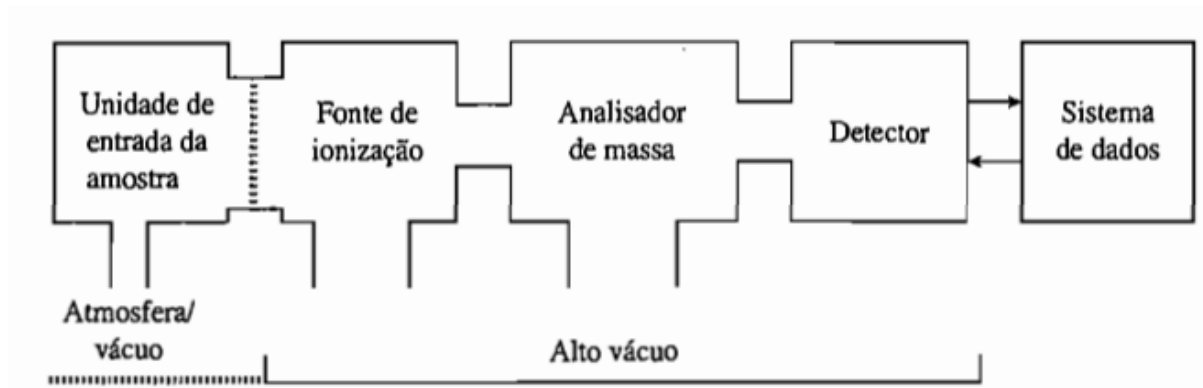
A literatura relata também as vantagens oferecidas pelo UPLC em detrimento do HPLC de fase reversa como um aumento de quase dez vezes na velocidade de varredura e um aumento de 3-5 vezes na sensibilidade da fase estacionária, comparado com uma fase estacionária convencional de 3,5  $\mu\text{m}$  (WILSON *et al.*, 2005). O UPLC-MS tem se tornado um dos pilares da proteômica e metabolômica para identificação de proteínas e metabólitos, respectivamente (ZHAO; LIN, *et al.*, 2014).

## 2.6 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) é um método instrumental usado para analisar fragmentos moleculares com base na sua massa. Para se obter o espectro de massas, espécies gasosas desordenadas de uma fase condensada são ionizadas e os íons, acelerados por um campo elétrico, são separados de acordo com sua razão massa/carga ( $m/z$ ) (HARRIS, 2010).

De forma simplificada, o espectrômetro de massas tem cinco componentes essenciais, representado na Figura 17. O primeiro constituinte do espectrômetro é o compartimento para injeção da amostra, onde a amostra no ambiente laboratorial (1 atm) é injetada em uma câmara de pressões mais baixas dentro do espectrômetro de massas. Em seguida, o material é encaminhado para um compartimento onde sofrera ionização por uma fonte de íons, sendo transformada em fragmentos de íons na fase gasosa. Esses íons gerados são acelerados por um campo eletromagnético até um analisador de massas que faz a separação dos íons com base na razão massa/carga ( $m/z$ ). Por fim, os íons são contabilizados por um detector e o sinal é registrado e processado por uma rede de dados (software) (PAVIA *et al.*, 2010).

**Figura 17** – Estrutura simplificada de um espectrômetro de massas.



**Fonte:** (PAVIA *et al.*, 2010)

O método de ionização utilizado neste trabalho foi a ionização por electrospray (ESI). O processo de ionização por ESI ocorre quando os analitos, bombeados através de um fino capilar de aço inoxidável, é submetida a altas tensões dispersando a amostra na forma de aerossol, em razão do forte campo elétrico, produzindo uma névoa com gotículas carregadas que fluem pela circulação do espectrômetro de massas até o analisador de massas (BRAMER, 1986). Uma característica importante do ESI é a propriedade de produzir íons multiplamente carregados partindo de grandes moléculas com diversos sítios ionizáveis, gerando espécies protonadas  $[M+nH]^{n+}$ , desprotonadas  $[M-nH]^{n-}$ , cationizadas  $[M+Na]^+$  ou anionizadas  $[M+Cl]^-$ , por exemplo (DALMÁZIO, 2007).

O analisador utilizado no presente trabalho é o quadrupolar constituído de quatro barras sólidas paralelas na direção do feixe de íons. Uma voltagem de corrente contínua (CC) e uma radiofrequência (RF) são aplicadas, gerando um campo eletroestático oscilante, de tal forma que os íons com a razão massa/carga correta passam com uma trajetória oscilante em direção ao detector. Esse tipo de espectrômetro de massas apresenta baixa resolução ( $R \sim 3000$ ), não sendo, portanto, capaz de fornecer a composição elementar exata da amostra (PAVIA *et al.*, 2010).

## 2.7 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica instrumental fundamental para a elucidação estrutural de compostos químicos baseado nas propriedades magnéticas dos núcleos atômicos (LUZYANIN; ABRANTES, 2010). Vários núcleos podem ser analisados por meio desta técnica, porém para que um isótopo possa ser analisado por RMN é necessário que

ele possua propriedades específicas, como massa ímpar ou número atômico ímpar, ou ambos, além de um estado de spin característico. Portanto, apesar da baixa abundância natural, os núcleos mais comumente trabalhados são os isótopos de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e carbono ( $^{13}\text{C}$ ) (PAVIA *et al.*, 2010).

O fenômeno da ressonância magnética nuclear ocorre quando os núcleos atômicos, que se comportam como pequenos ímãs, são dispostos sob um intenso campo magnético externo ( $B_0$ ) forçando-os a se alinharem e absorverem energia, alterando sua orientação de spin, quando a frequência do aparelho corresponde exatamente à frequência característica do núcleo atômico (designada por frequência de Larmor). Ao sofrerem relaxamento, os núcleos retornam ao seu estado fundamental, emitindo sinais eletromagnéticos que são detectados e tratados matematicamente, através da Transformada de Fourier (FT), gerando um gráfico de frequência de sinal em função da frequência aplicada, comumente conhecido como espectro de RMN (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar quimicamente os extratos acetato de etila e lipopeptídeo obtidos do caldo fermentativo das cepas de bactérias *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* por meio de Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Preparar os extratos acetato de etila e lipopeptídeo das espécies *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. stratosphericus*, *B. subtilis* e *Azospirillum brasilense*;
- Caracterizar os extratos utilizando técnicas espectrométricas: UPLC-MS e RMN <sup>1</sup>H;
- Relacionar os compostos presentes nos extratos acetato de etila com as atividades biológicas descritas na literatura.

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e preparo dos extratos acetato de etila e lipopeptídeo do caldo fermentativo das espécies *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. stratosphericus*, *B. subtilis* e *A. brasilense*

Os caldos fermentativos livres de células foram preparados a partir do meio de cultura composto por (g/L): Dextrose 10,0; Extrato de levedura 5,0; Extrato de carne 3,0; Peptona de carne 5,0; Sulfato de amônia 3,0; Sulfato de Magnésio Heptahidratado 0,5. Os meios de cultura foram incubados em BOD por 24 horas, as cepas foram transferidas assepticamente com o auxílio de uma alça estéril para um Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio de cultura autoclavado (121°C, 15 min) e, então, foram incubados a 30°C, centrifugados a 200 rpm durante 16 horas. Após a fermentação, o material foi centrifugado durante 15 min, a 3600 rpm e 25°C, recolhendo o efluente e separando-o da biomassa precipitada.

A codificação e origem dos caldos fermentativos das espécies de *Bacillus* e *Azospirillum* usados no trabalho estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2** – Codificação e origem das amostras microbiológicas usadas.

Codificação	Microorganismo	Origem
501	<i>Bacillus subtilis</i>	Agrobiologia - BR10788 - Pseudo SMF 613-6
502	<i>Azospirillum sp.</i>	Agrobiologia - BR13925 - NRB 085
503	<i>Azospirillum brasilense</i>	Agrobiologia - BR12186 - Ab - V5
504	<i>Azospirillum brasilense</i>	Agrobiologia - BR12391 - Ab - V6
505	<i>Bacillus stratosphericus/Bacillus pumilus</i>	CNPAT - LPPC 159 (61)
506	<i>Bacillus cereus</i>	CNPAT - LPPC 170 (186)
507	<i>Bacillus cereus</i>	CNPAT - LPPC 265
508	<i>Bacillus safensis/Bacillus pumilus</i>	CNPAT - LPPC 272
510	<i>Bacillus sp.</i>	CPATSA
511	<i>Bacillus sp.</i>	CPATSA
512	<i>Bacillus sp.</i>	CPATSA

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente, em seguida 100 mL de cada material foi adicionado a um funil de separação com 70 mL de acetato de etila. A mistura foi agitada manualmente e deixada 10 minutos em descanso para a completa separação de fases. A fase orgânica (superior) foi coletada em um Erlenmeyer enquanto a fase aquosa (inferior) foi submetida a mais duas replicatas do processo de partição descrito. As frações orgânicas obtidas



foram secas com sulfato de sódio e transferidas para um balão de fundo redondo para rotaevaporação do acetato de etila a 30° C com auxílio do rotaevaporador da marca IKA® RV 10. O material final obtido foi transferido com metanol para um frasco de vidro, previamente tarado, secado, pesado e armazenado em local protegido do calor e da umidade.

O extrato lipopeptídico (ExtLP) foi obtido através da precipitação ácida do caldo fermentativo. Mediu-se 100 mL de caldo fermentado e adicionou-se gradativamente HCl 6,0 mol/L até o pH da amostra atingir 2,0. Então, o material foi deixado em repouso na geladeira durante 48 horas para precipitação dos lipopeptídeos, armazenado em tubos falcon. Após o descanso, as suspensões foram centrifugadas a 4000 rpm durante 30 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e os extratos, depois de secos, foram pesados e armazenados em local protegido do calor e umidade. A Tabela 3 apresenta as massas obtidas para cada extração realizada em cada amostra.

**Tabela 3** – Massa dos extratos acetato de etila (ExtAcOEt) e lipopeptídico (ExtLP) das cepas de *Bacillus* e *Azospirillum*.

Amostra	ExtAcOEt	ExtLP
<b>Não Inoculado</b>	12,3 mg	19,0 mg
<b>501</b>	15,1 mg	49,0 mg
<b>502</b>	11,3 mg	-
<b>503</b>	8,0 mg	-
<b>504</b>	9,1 mg	-
<b>505</b>	12,1 mg	-
<b>506</b>	19,3 mg	-
<b>507</b>	12,5 mg	-
<b>508</b>	8,9 mg	-
<b>510</b>	4,1 mg	6,3 mg
<b>511</b>	13,5 mg	-
<b>512</b>	13,1 mg	8,7 mg

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

#### 4.2 Análise do perfil cromatográfico por UPLC-QDA-MS

Os extratos obtidos foram analisados através de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) com detector QDA (Water Corps, Milford, MA, EUA) acoplado a um espectrômetro de Massas (MS). As análises foram efetuadas em um sistema equipado com uma

fonte de ionização com interface de electrospray (ESI) e em coluna C18 Waters Acquity UPLC BEH (150x 2,1 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ ) mantida a temperatura constante de 40° C, utilizando como fase móvel água Milli-Q (A) e acetonitrila (B) ambos com 0,1% v/v de ácido fórmico (pH  $\approx$  3,00). As amostras foram submetidas a gradiente com a variação: 0 min, 2% (B), 2 min, 2% (B), 10 min, 65% (B), 15 min, 98% (B), 17 min, 98% (B), 17,01 min, 2% (B), 19 min, 2% (B). O fluxo foi de 0,4 mL/min e o volume de injeção 5  $\mu\text{L}$ . Os espectros de massa foram adquiridos nos modos positivo e negativo numa gama de massa entre 350-1250 Da para as análises em full scan. A identificação dos compostos foi efetuada a partir da correlação das massas monoisotópicas calculadas para cada metabólito secundário descrito na revisão bibliográfica com as razões  $m/z$  observadas nos espectros de massas para cada pico registrado em cada cromatograma dos extratos acetato de etila.

O modo SIM (do inglês *Selected Ion Monitoring*) foi utilizado para detecção dos lipopeptídeos nos extratos exibindo íons  $[M + H]^+$  e  $[M + 2H]^{2+}$ . Como o limite máximo de detecção de massa do equipamento é 1250 Da e as fengicinas possuem íons com massas entre 1435 e 1505 Da, os íons  $[M + 2H]^{2+}$  foram usados na identificação das fengicinas. Os dados foram analisados com auxílio do software Masslynx 4.1 (Waters Corporation). Os extratos acetato de etila e lipopeptídeo de cada amostra foram submetidos a análise pelo UPLC-QDA-MS no método SIM a fim de monitorar a presença de lipopeptídeos característicos, de acordo com o reportado na tese de Souza (2019). Amostras padrões das famílias das Iturinas, Fengicinas e Surfactinas, obtidas e previamente caracterizadas (Souza, 2019), foram avaliadas quanto à presença de seus constituintes para serem utilizados como referência de tempo de retenção.

### 4.3 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleos de  $^1\text{H}$ ) e equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (H-F/15N-31P) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”. As amostras foram preparadas dissolvendo-se 4 mg dos extratos em 600  $\mu\text{L}$  de metanol deuterado com 0,17 mg/mL de TSP-d4. Os dados obtidos foram correlacionados com os da literatura para a identificação dos sinais de maior intensidade característicos dos lipopeptídeos presentes nos extratos lipopeptídeos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Extração líquido-líquido e precipitação ácida do caldo fermentativo

A extração por partição líquido-líquido mostrou-se um processo eficiente para análise do perfil cromatográfico das amostras de caldo fermentado livre de células, uma vez que as moléculas altamente hidrofílicas de pouco interesse não são extraídas pelo acetato de etila, logo não estão presentes no extrato orgânico. De forma análoga, a extração por precipitação ácida, seletiva para lipopeptídeos, assegurou a obtenção das moléculas de interesse em rendimentos superiores aos da extração usual apesar da baixa velocidade do processo.

Nos extratos acetato de etila, os rendimentos das extrações apresentaram valores baixos exibindo rendimento máximo de 0,0151 % para o *Bacillus subtilis* e mínimo de 0,0041 % para o *Bacillus sp.* Nos extratos lipopeptídeos, os rendimentos das extrações foram significativamente superiores aos dos demais extratos, tendo rendimento máximo de 0,0490 % para o *Bacillus subtilis* e mínimo de 0,0063 % para o *Bacillus sp.* A Tabela 4 apresenta os rendimentos obtidos para cada extração realizada.

**Tabela 4** – Rendimentos das extrações realizadas com cepas de *Bacillus* e *Azospirillum*.

Amostra	Rendimento (Ext. AcOEt)	Rendimento (ExtLP)
<b>Não Inoculado</b>	0,0123 %	0,0190 %
<b>501</b>	0,0151 %	0,0490 %
<b>502</b>	0,0113 %	-
<b>503</b>	0,0080 %	-
<b>504</b>	0,0091 %	-
<b>505</b>	0,0121 %	-
<b>506</b>	0,0193 %	-
<b>507</b>	0,0125 %	-
<b>508</b>	0,0089 %	-
<b>510</b>	0,0041 %	0,0063 %
<b>511</b>	0,0135 %	-
<b>512</b>	0,0131 %	0,0087 %

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

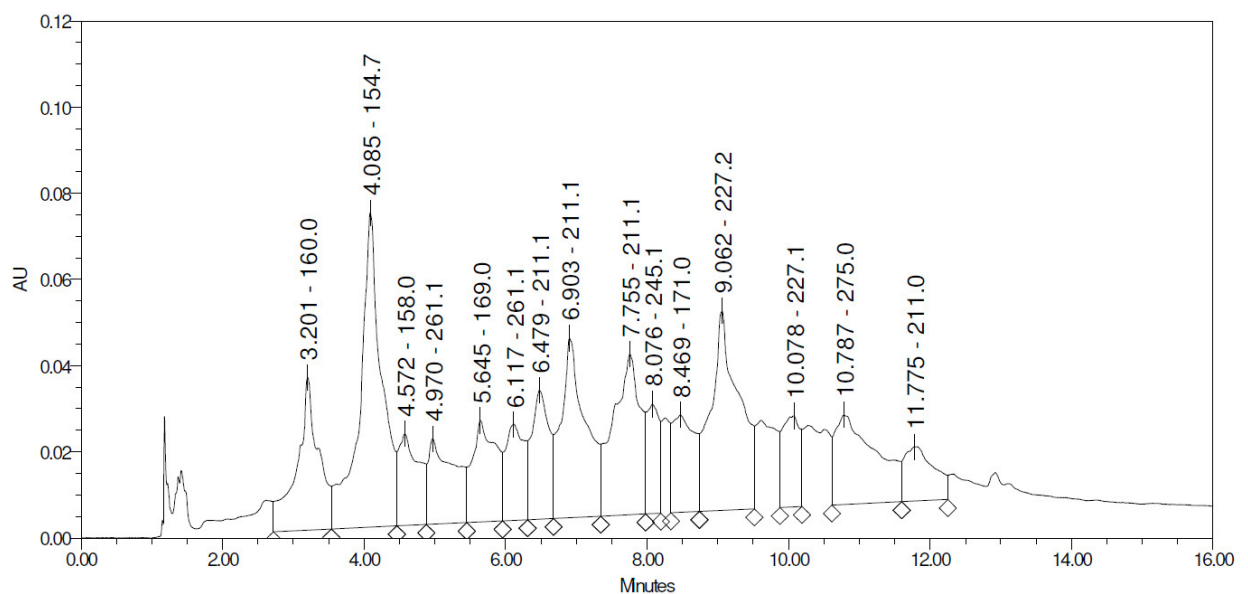
De acordo com a tese de Souza (2017), os rendimentos dos extratos acetato de etila das cepas de *Bacillus* e *Azospirillum* tratadas apresentaram rendimentos inferiores ao esperado. Esses valores podem estar associados a técnica adotada, sendo indicativo de que pequenas

quantidades de solvente foram utilizadas na partição. Para o extrato não-inoculado, pode-se associar a massa obtida de extrato acetato de etila (12,3 mg) à composição rica em nutrientes do meio de cultura, contendo açúcares (dextroses) e proteínas (extrato de carne e peptona de carne), que se fazem presentes também no seu extrato lipopeptídico. Já os extratos lipopeptídicos das amostras inoculadas evidenciaram rendimentos superiores de extração comparados com os extratos acetato de etila, comprovando a seletividade dessa técnica de separação.

## 5.2 Determinação estrutural dos compostos majoritários no extrato acetato de etila por UPLC-QDA

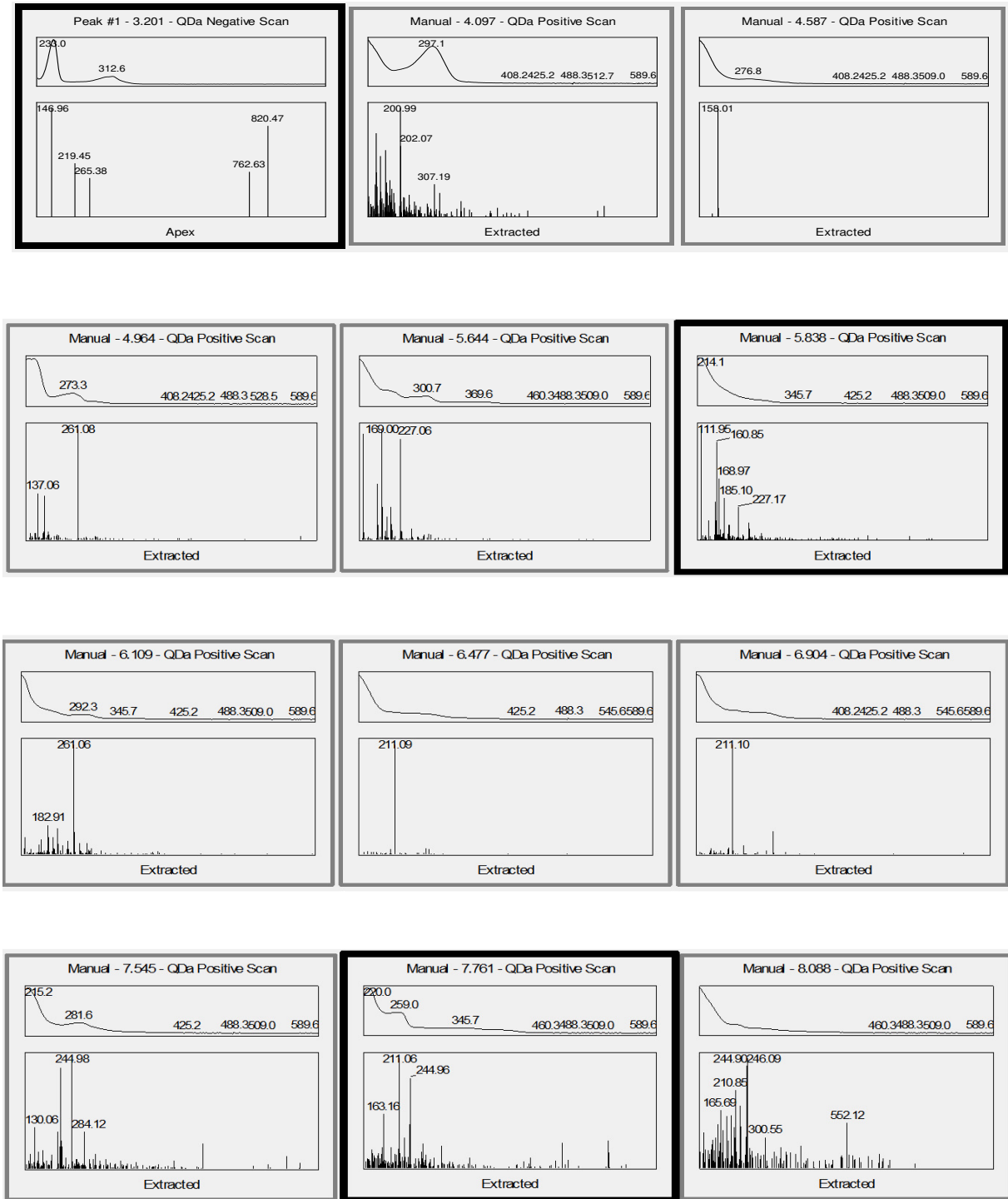
As análises por UPLC-QDA dos extratos acetato de etila dos caldos fermentativos livre de células apresentaram cromatogramas com vários picos. Os espectros de massas foram obtidos no modo de ionização negativo e positivo (ESI<sup>-</sup> e ESI<sup>+</sup>), porém apenas no modo de ionização positiva observou-se os picos nos cromatogramas com boa resolução e alta razão sinal/ruído. O cromatograma da amostra 501, referente ao *Bacillus subtilis*, está apresentado na Figura 18 e os espectros de massas e UV-vis dos picos característicos encontram-se na Figura 19.

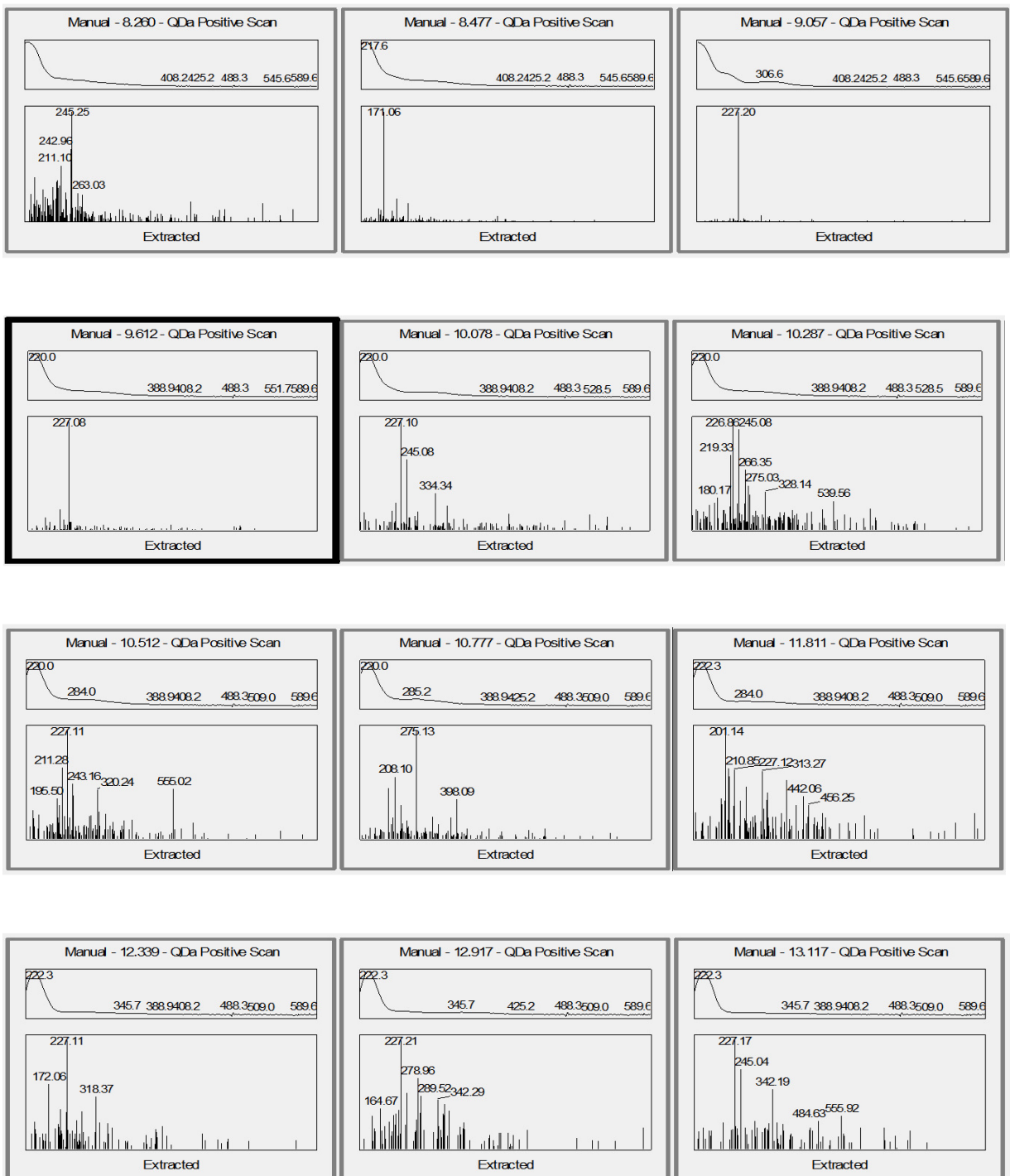
**Figura 18** – Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 501 (*Bacillus subtilis*).



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 19** – Espectros de massas e UV-vis dos picos característicos no extrato acetato de etila da amostra 501 (*Bacillus subtilis*).





**Fonte:** Elaborado pelo autor.

A Tabela 5 expõe os dados obtidos dos espectros de massas no modo de ionização positivo para cada extrato acetato de etila. Os picos foram relacionados as substâncias previamente descritas na revisão bibliográfica para os gêneros *Bacillus* e *Azospirillum*. Apesar da grande quantidade de picos registrados, apenas os picos que foram possíveis correlacionar com os dados relatados estão expressos na tabela.

**Tabela 5** – Dados dos espectros de massas obtidos no UPLC-QDA.

<b>Amostra</b>	<b>Número do Pico*</b>	<b>TR (min)</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>Fórmula Molecular</b>	<b>Substância Proposta</b>	<b>Ref.</b>
<b>501 <i>Bacillus subtilis</i></b>	9	6,904	211,10	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Pro-D-Leu) <b>(1)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	10	7,575	284,12	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Trp-L-Pro) <b>(33)</b>	KHAN <i>et al.</i> , 2020
<b>502 (<i>Azospirillum sp.</i>)</b>	10	6,458	211,07	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Pro-D-Leu) <b>(1)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	11	6,741	245,08	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(L-Pro-D-Phe) <b>(3)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	16	8,417	300,06	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>8</sub> P	Fosfatidiletanolamina <b>(37)</b>	KHAN <i>et al.</i> , 2020
<b>503 (<i>Azospirillum brasilense</i>)</b>	10	6,468	211,12	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Pro-D-Leu) <b>(1)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	11	6,943	245,09	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(L-Pro-D-Phe) <b>(3)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	12	7,577	284,19	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Trp-L-Pro) <b>(33)</b>	KHAN <i>et al.</i> , 2020
<b>504 (<i>Azospirillum brasilense</i>)</b>	9	5,266	197,11	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(L-Pro-L-Val) <b>(4)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	13	6,481	211,07	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Pro-D-Leu) <b>(1)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	16	7,651	245,13	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(L-Pro-D-Phe) <b>(3)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
<b>505 (<i>Bacillus stratosphericus/B. pumilus</i>)</b>	5	3,642	245,07	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ciclo(L-Pro-D-Phe) <b>(3)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	12	5,212	197,00	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(L-Pro-L-Val) <b>(4)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	17	6,445	211,10	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Pro-D-Leu) <b>(1)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	28	10,848	212,64	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub>	2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoaxi-3H(4H)-ona <b>(64)</b>	AHMAD <i>et al.</i> , 2011

<b>506 (<i>Bacillus cereus</i>)</b>	10	6,443	211,13	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Pro-D-Leu) <b>(1)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	12	7,434	284,16	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Trp-L-Pro) <b>(33)</b>	KHAN <i>et al.</i> , 2020
	13	7,655	245,10	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(L-Pro-D-Phe) <b>(3)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	26	14,903	288,06	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub>	N-óxido de 2-nonil-4-hidroxiquinolina <b>(21)</b>	KHAN <i>et al.</i> , 2020
<b>507 (<i>Bacillus cereus</i>)</b>	7	5,238	197,11	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(L-Pro-L-Val) <b>(4)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	11	6,440	211,13	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Pro-D-Leu) <b>(1)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	13	7,643	245,15	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ciclo(L-Pro-D-Phe) <b>(3)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
<b>508 (<i>Bacillus safensis</i>/<i>B. pumilus</i>)</b>	8	6,438	211,12	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Pro-D-Leu) <b>(1)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	9	7,028	245,08	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ciclo(L-Pro-D-Phe) <b>(3)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
<b>510 (<i>Bacillus sp.</i>)</b>	8	6,451	211,08	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Pro-D-Leu) <b>(1)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	11	7,776	245,06	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ciclo(L-Pro-D-Phe) <b>(3)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
<b>511 (<i>Bacillus sp.</i>)</b>	10	6,440	211,14	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Pro-D-Leu) <b>(1)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	11	6,940	245,22	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ciclo(L-Pro-D-Phe) <b>(3)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	12	7,661	284,10	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Trp-L-Pro) <b>(33)</b>	KHAN <i>et al.</i> , 2020
	15	9,386	315,92	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Lipoamida B <b>(15)</b>	BERRUE <i>et al.</i> (2009)
	18	10,584	212,17	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub>	2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoaxi-3H(4H)-ona <b>(64)</b>	AHMAD <i>et al.</i> , 2011



	19	14,875	556,07	C <sub>34</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>4</sub>	hidroxipalmitoil esfinganina <b>(22)</b>	KHAN <i>et al.</i> , 2020
<b>512 (<i>Bacillus sp.</i>)</b>	9	6,460	211,10	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Pro-D-Leu) <b>(1)</b>	KUMAR <i>et al.</i> (2013)
	11	7,564	284,09	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(D-Trp-L-Pro) <b>(33)</b>	KHAN <i>et al.</i> , 2020
	15	8,425	556,92	C <sub>34</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>4</sub>	hidroxipalmitoil esfinganina <b>(22)</b>	KHAN <i>et al.</i> , 2020

\*Número do pico = ordem, de acordo com o tempo de retenção, que o pico foi observado no cromatograma amostral.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Apesar da ausência de informações referente ao padrão de fragmentação das moléculas analisadas, pode-se fazer algumas proposições acerca das substâncias indicadas nos cromatogramas de acordo com o levantamento bibliográfico. Identificou-se 9 metabólitos secundários previamente relatados sendo, 4 da classe dos peptídeos cíclicos, 1 benzoaxizinoíde, 1 lipoamida, 1 derivado da esfingosina, N-óxido de 2-nonil-4-hidroiquinolina e fosfatidiletanolamina. O ciclopeptídeo Ciclo(L-Pro-L-Val) (4) de  $m/z$  197,1290 foi relacionado aos picos com  $t_r = 5,24$  min presentes nas amostras 504, 505 e 507. Já o pico com  $m/z$  211,14, referente ao ciclopeptídeo ciclo(D-Pro-D-Leu) (1), mostrou-se presente em todos os extratos acetatos de etila analisados. O íon molecular observado no ESI<sup>+</sup> condiz com a massa monoisotópica esperada para essa substância, no extrato acetato de etila 501 o composto (1) apresentou  $m/z$  211,10 ( $t_r = 6,90$  min, F.M. = C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Analogamente, o pico associado à substância Ciclo(D-Trp-L-Pro) (33), com  $m/z$  284,1399 ( $t_r = 7,58$  min, F.M. = C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>), foi encontrado nas amostras 501, 503, 506, 511 e 512.

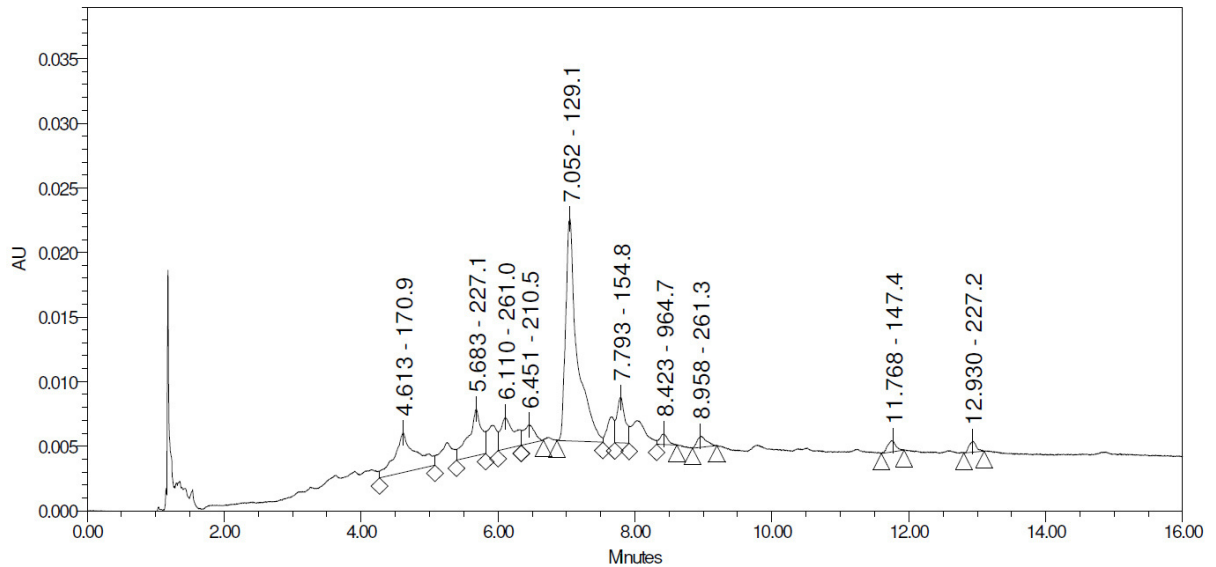
O pico com  $m/z$  245,1290 (F.M. = C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), relacionado ao ciclo peptídeo ciclo(L-Pro-D-Phe) (3), foi associado ao pico com  $t_r = 7,65$  min na maioria dos extratos, com exceção das amostras 501 e 512. O extrato 502 apresentou um pico com  $t_r = 8,42$  min e  $m/z$  300,06 referente à presença da Fosfatidiletanolamina (37) ( $m/z$  300,0848 e F.M. = C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>8</sub>P).

Os extratos 505 e 511 mostraram picos com  $t_r = 10,84$  min e  $t_r = 10,58$  min, respectivamente, associados à presença da 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoaxi-3H(4H)-ona (64) ( $m/z$  212,0559 e F.M. = C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>). Os cromatogramas dos extratos acetato de etila das amostras 511 e 512 mostraram picos com  $t_r = 14,88$  min e  $t_r = 8,42$  min associados à hidroxipalmitoil esfingalina (22), que possui  $m/z$  556,5305 e F.M. = C<sub>34</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>4</sub>. O extrato acetato de etila do *Bacillus cereus* indicou um pico com  $t_r = 14,90$  min que se propõe pertencer ao N-óxido de 2-nonil-4-hidroiquinolina (21) em razão do seu íon molecular condizer com o relatado na literatura ( $m/z$  288,1964 e F.M. = C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>).

Dessa forma, foram identificados 2 compostos para o extrato acetato de etila *Bacillus subtilis* (1 e 33), 3 para o extrato acetato de etila *Azospirillum sp* (1, 3 e 37), 3 para o extrato acetato de etila *Azospirillum brasilense* (1, 3 e 33), 3 para o extrato acetato de etila *Azospirillum brasilense* (1, 3 e 4), 4 para o extrato acetato de etila *Bacillus stratosphericus/ Bacillus pumilus* (1, 3, 4 e 64), 4 para o extrato acetato de etila *Bacillus cereus* (1, 3, 21 e 33), 3 para o extrato acetato de etila *Bacillus cereus* (1, 3 e 4), 2 para o extrato acetato de etila *Bacillus safensis/ Bacillus pumilus* (1 e 3), 2 para o extrato acetato de etila *Bacillus sp* (1 e 3), 6 para o extrato acetato de etila *Bacillus sp* (1, 3, 15, 22, 33 e 64) e 3 para o extrato acetato de etila *Bacillus sp* (1, 22 e 33).

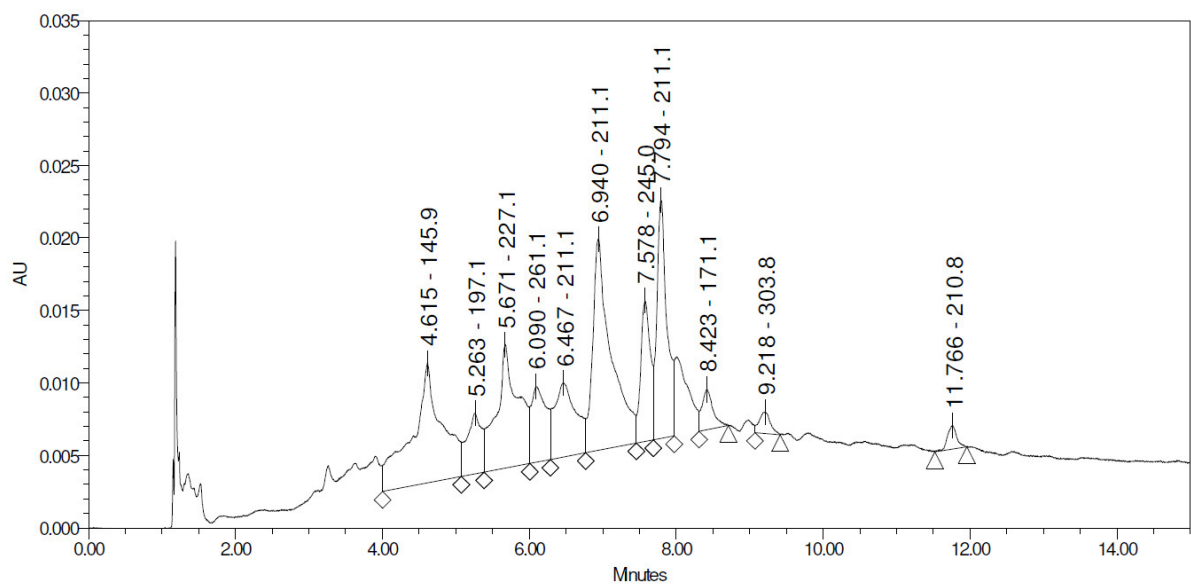
Os cromatogramas dos extratos acetato das demais amostras encontram-se nas figuras a seguir, enquanto seus espectros de massas e UV-vis referentes a cada pico presente nos extratos estão apresentados nos Anexos desse trabalho (p. 90-108).

**Figura 20** – Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 502 (*Azospirillum sp.*).



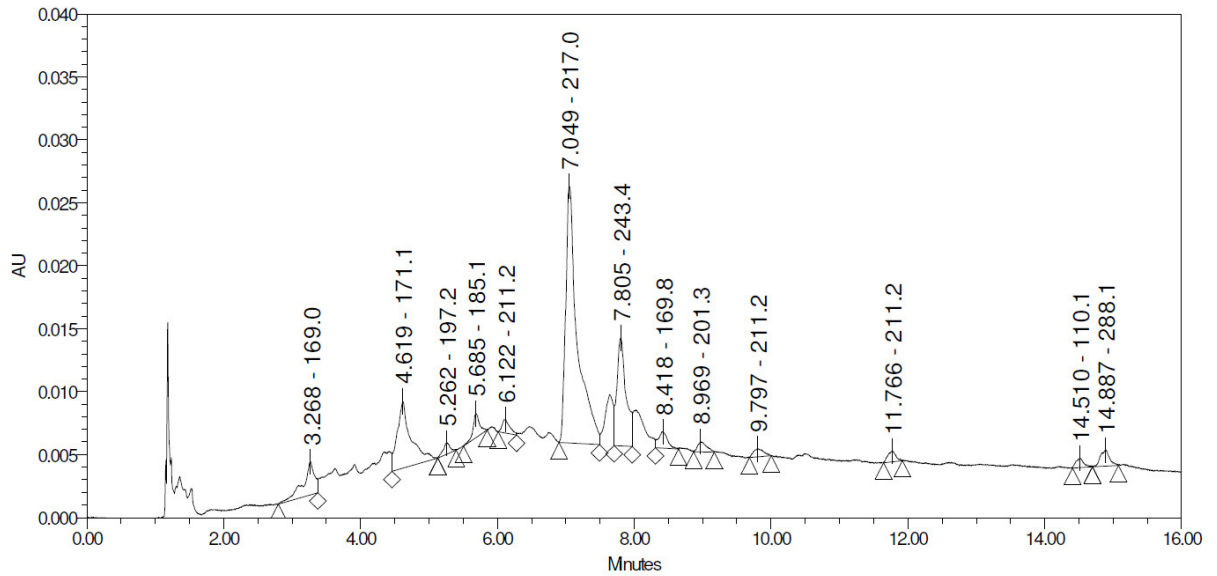
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 21** - Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 503 (*Azospirillum brasilense*).



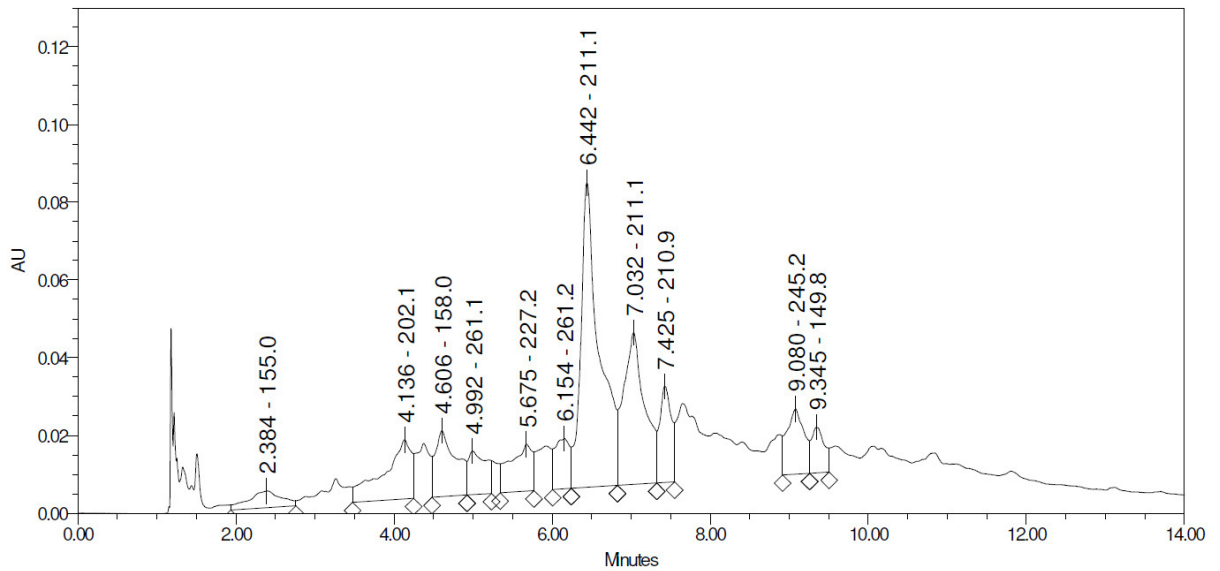
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 22** – Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 504 (*Azospirillum brasilense*).



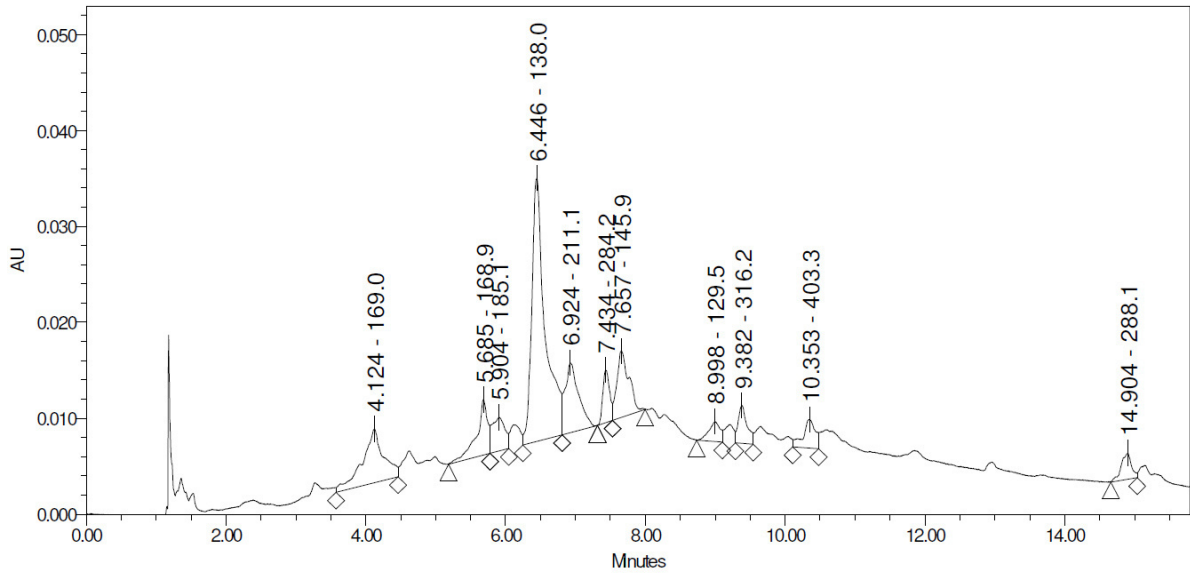
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 23** – Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 505 (*Bacillus stratosphericus/Bacillus pumillus*).



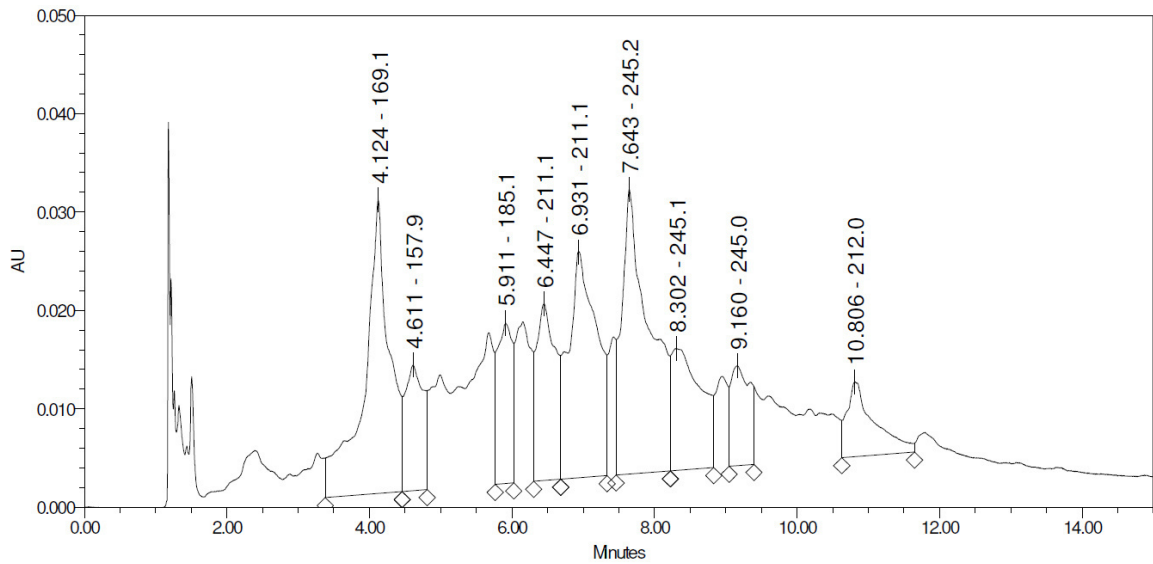
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 24** – Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 506 (*Bacillus cereus*).



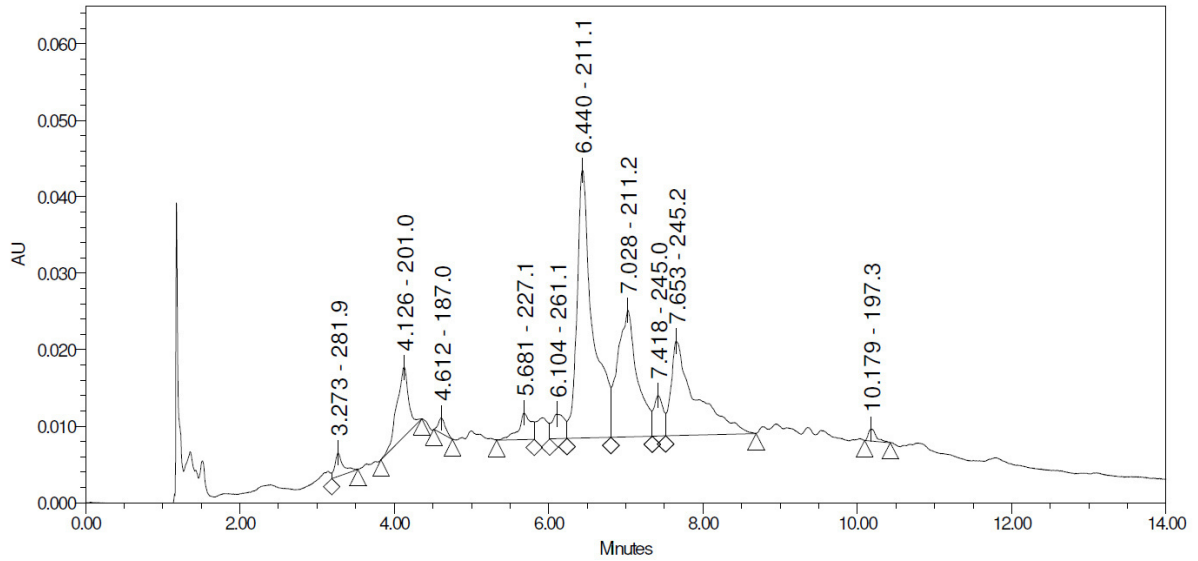
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 25** – Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 507 (*Bacillus cereus*).



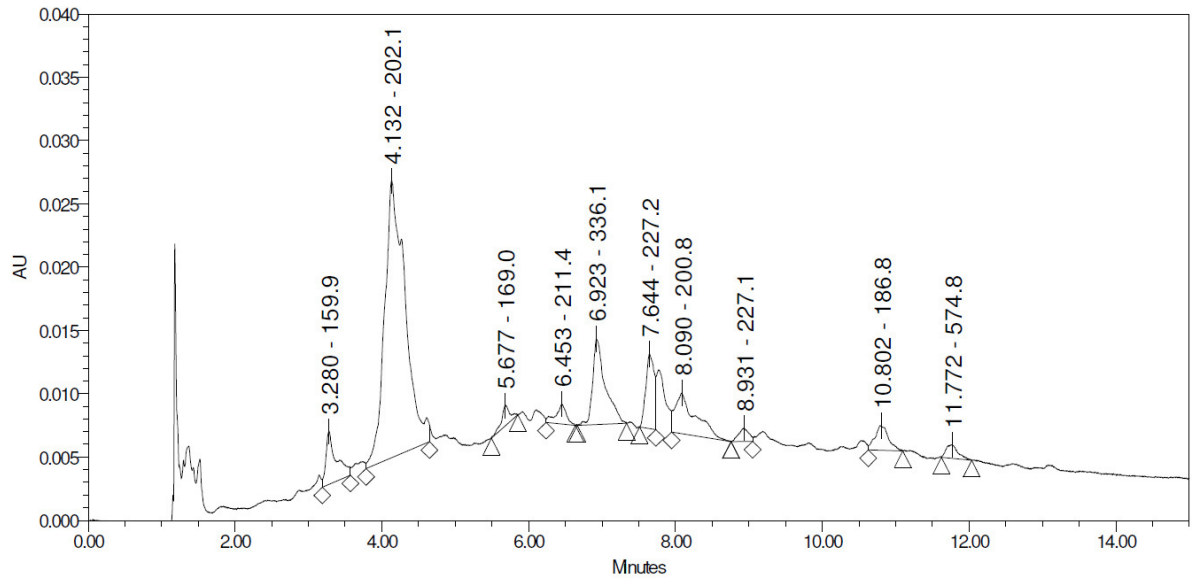
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 26** – Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 508 (*Bacillus safensis*/*Bacillus pumilus*).



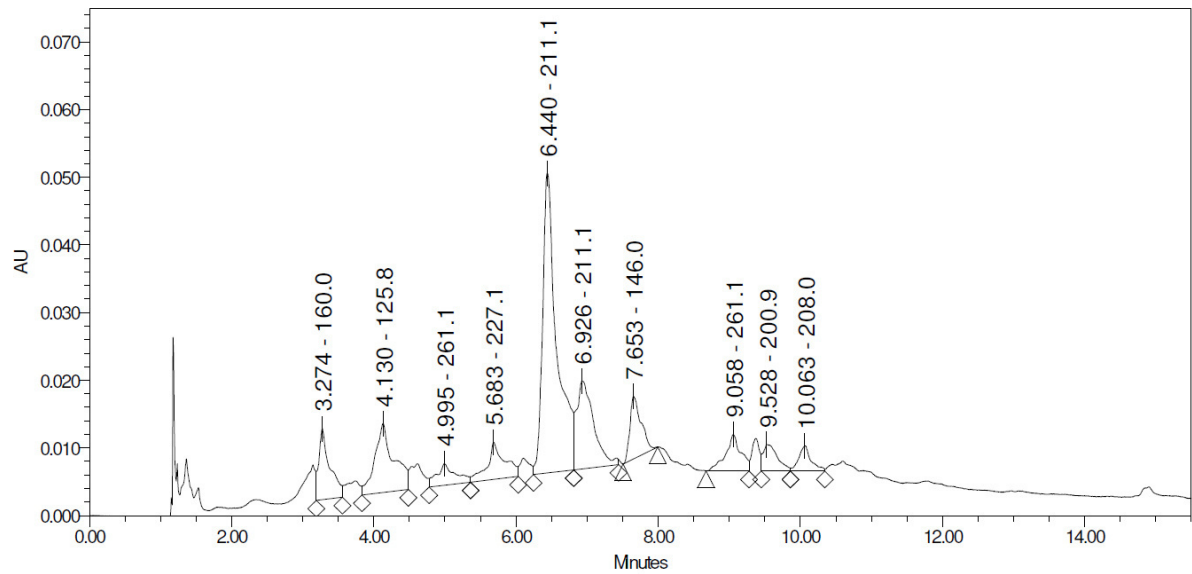
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 27** – Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 510 (*Bacillus sp.*).



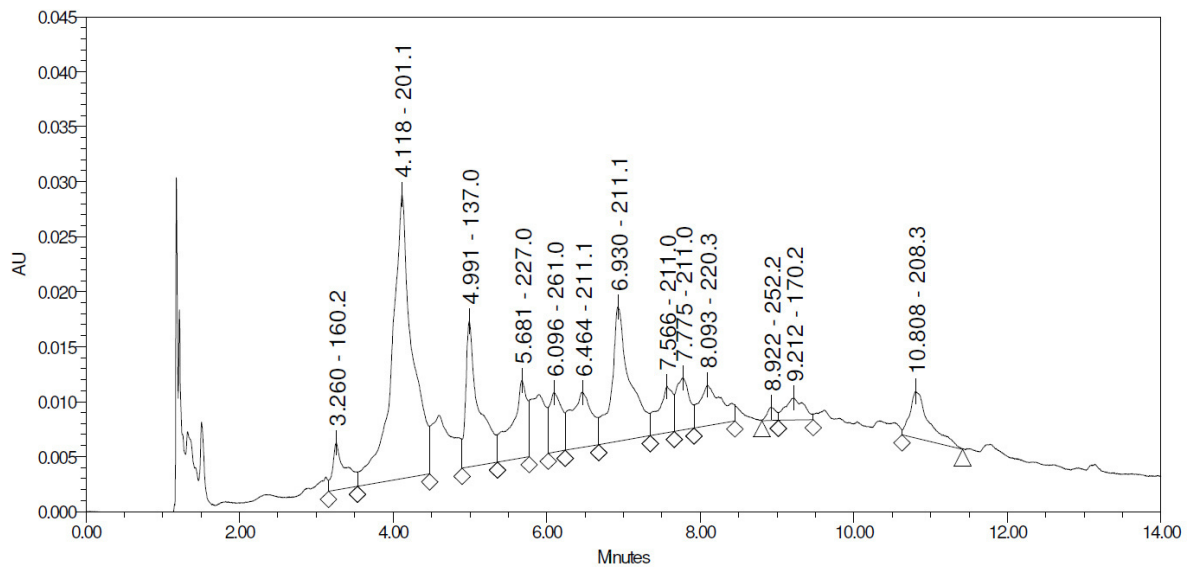
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 28** – Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 511 (*Bacillus sp.*).



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 29** – Cromatograma obtido no UPLC-QDA para o extrato acetato de etila da amostra 512 (*Bacillus sp.*).



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 5.3 Identificação dos lipopeptídeos presentes no extrato lipopeptídeo pelo método SIM

A Tabela 6 expressa os dados de  $[M + H]^+$  e  $[M+2H]^{2+}$ , tempo de retenção e área relativa de cada lipopeptídeos obtidos a partir dos extratos padrões.

**Tabela 6** – Dados dos lipopeptídeos presentes nos extratos padrões.

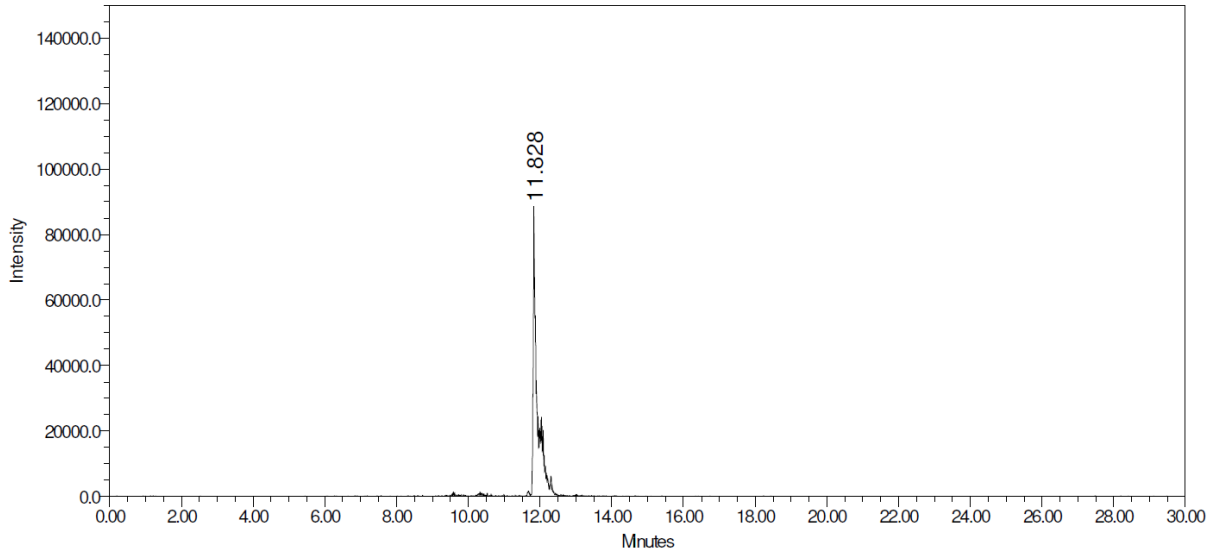
<b>Extrato Padrão de Iturina</b>				
<b>Lipopeptídeo</b>	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área</b>
<b>Iturina A2</b>	1043,5	-	11,828	681474
<b>Iturina A3-A5</b>	1057,5	-	12,541	1965767
<b>Iturina A6-A7</b>	1071,5	-	13,354	627488
<b>Extrato Padrão de Fengicina</b>				
<b>Lipopeptídeo</b>	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área</b>
<b>Fengicina A</b>	-	718,3	13,25	1239868
<b>Fengicina A</b>	-	725,4	13,67	3060792
<b>Fengicina B</b>	-	739,4	14,52	8722691
<b>Fengicina A</b>	-	732,4	14,20	12078164
<b>Fengicina B</b>	-	746,4	14,62	10761064
<b>Fengicina B</b>	-	753,4	15,11	10403431
<b>Extrato Padrão de Surfactina</b>				
<b>Lipopeptídeo</b>	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área</b>
<b>Surfactina</b>	1008,6	-	20,261	7082

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

As figuras que seguem abaixo mostram os perfis dos cromatogramas obtidos para cada lipopeptídeo presente em cada extrato padrão avaliado.

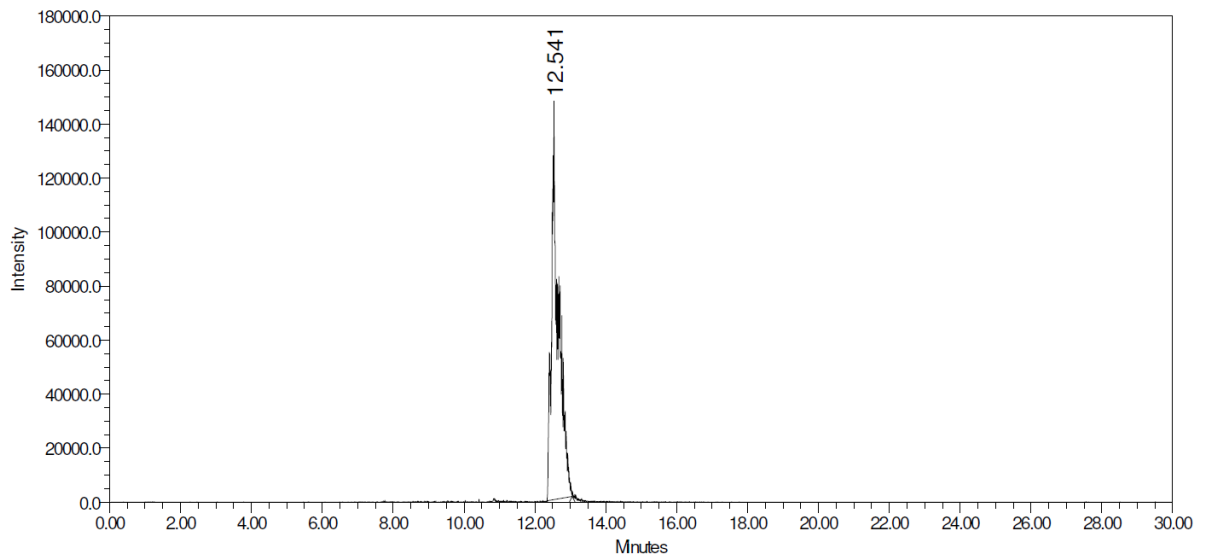


**Figura 30** – Perfil cromatográfico da Iturina A2 com  $[M + H]^+ = 1043,5$ .



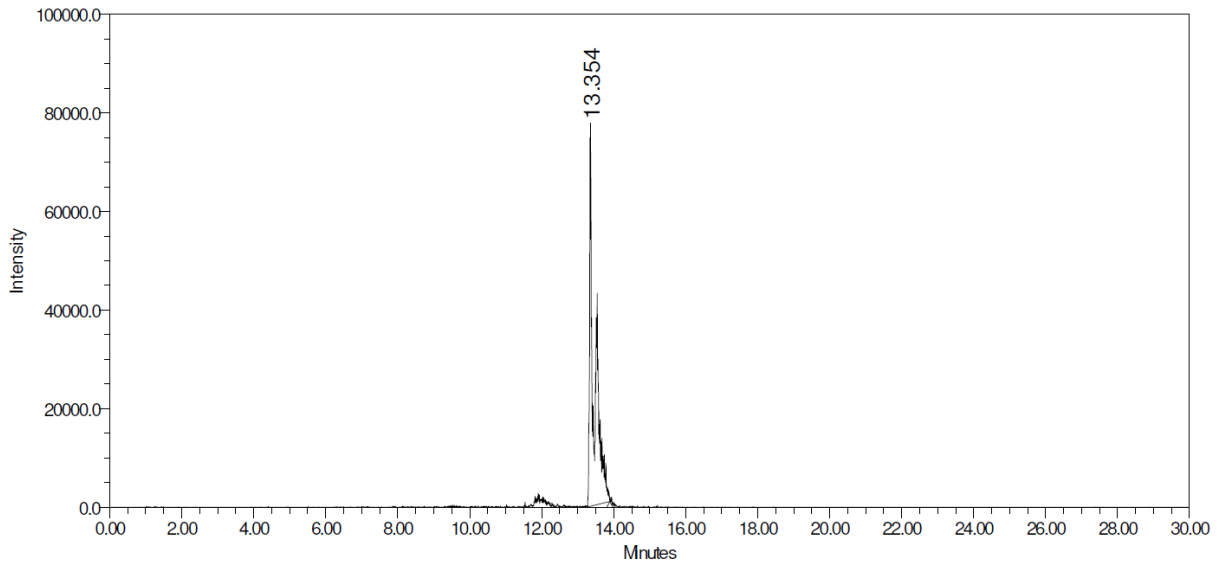
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 31** – Perfil cromatográfico da Iturina A3-A5 com  $[M + H]^+ = 1057,5$ .



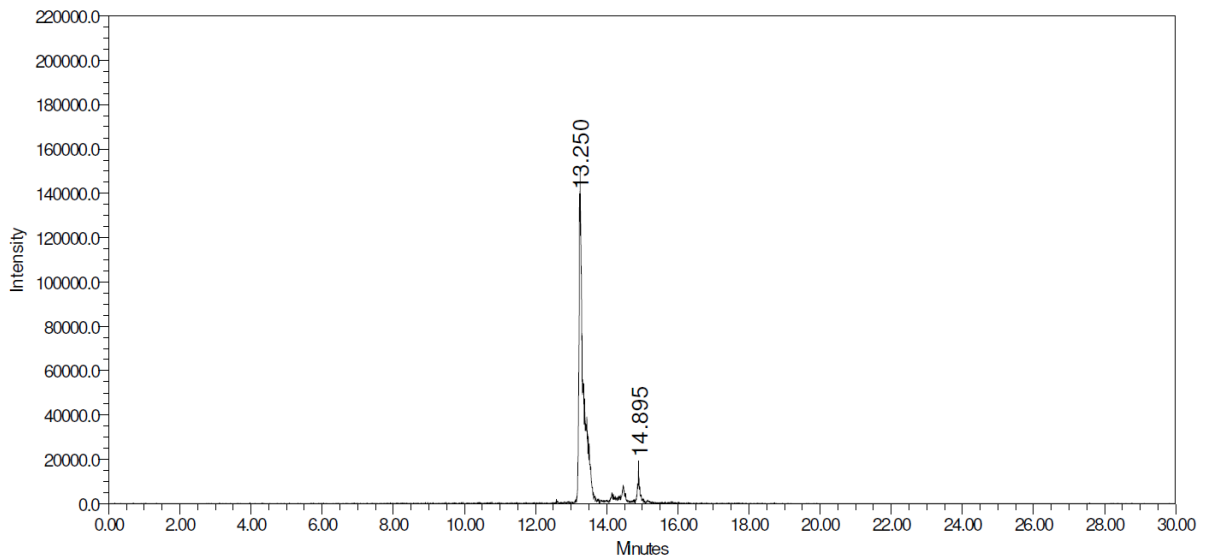
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 32** – Perfil cromatográfico da Iturina A6-A7 com  $[M + H]^+ = 1071,5$ .



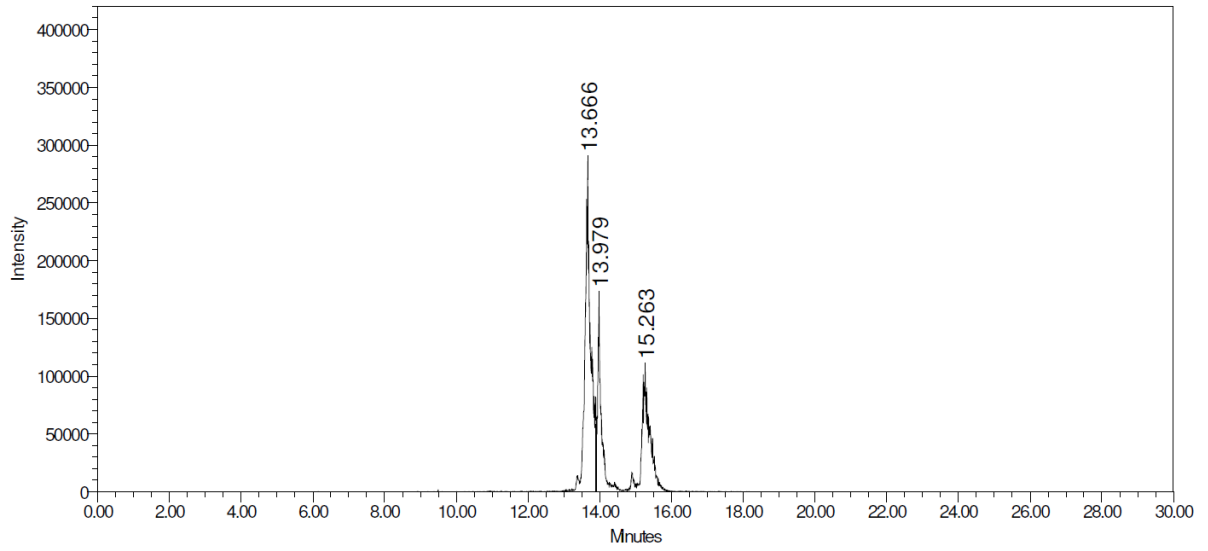
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 33** – Perfil cromatográfico da Fengicina A com  $[M + 2H]^{2+} = 718,3$ .



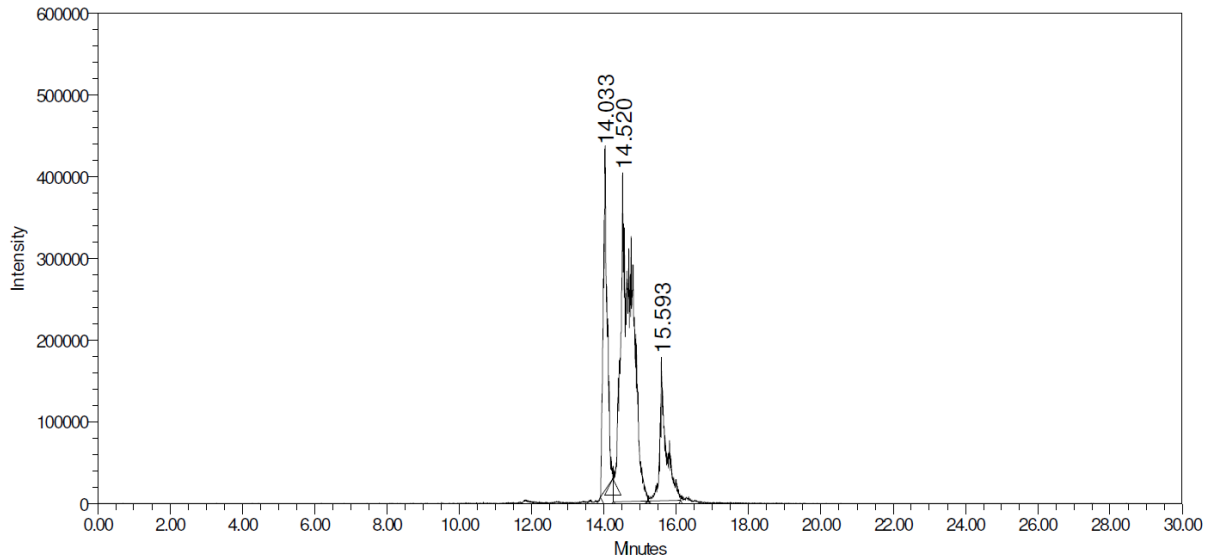
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 34** – Perfil cromatográfico da Fengicina A com  $[M + 2H]^{2+} = 725,4$ .



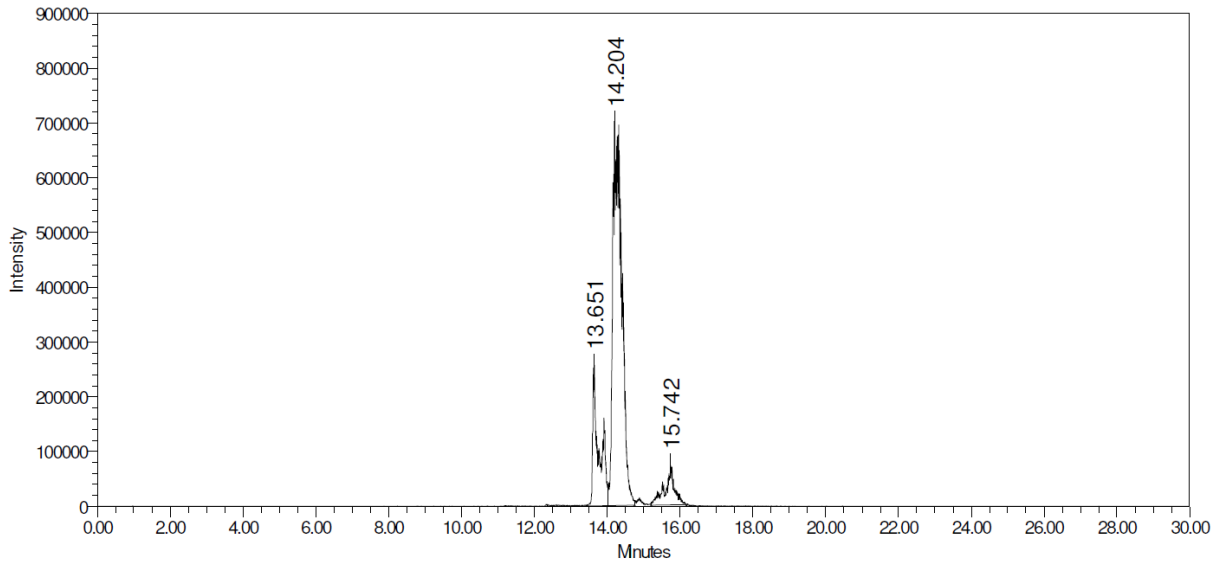
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 35** – Perfil cromatográfico da Fengicina B com  $[M + 2H]^{2+} = 739,4$ .



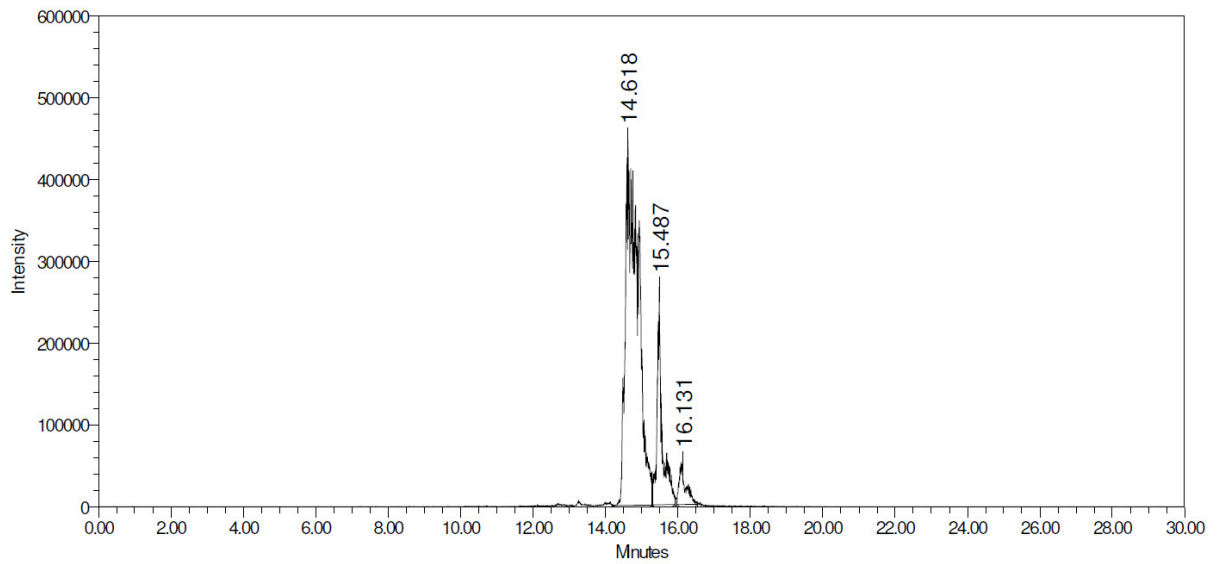
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 36** – Perfil cromatográfico da Fengicina A com  $[M + 2H]^{2+} = 732,4$ .



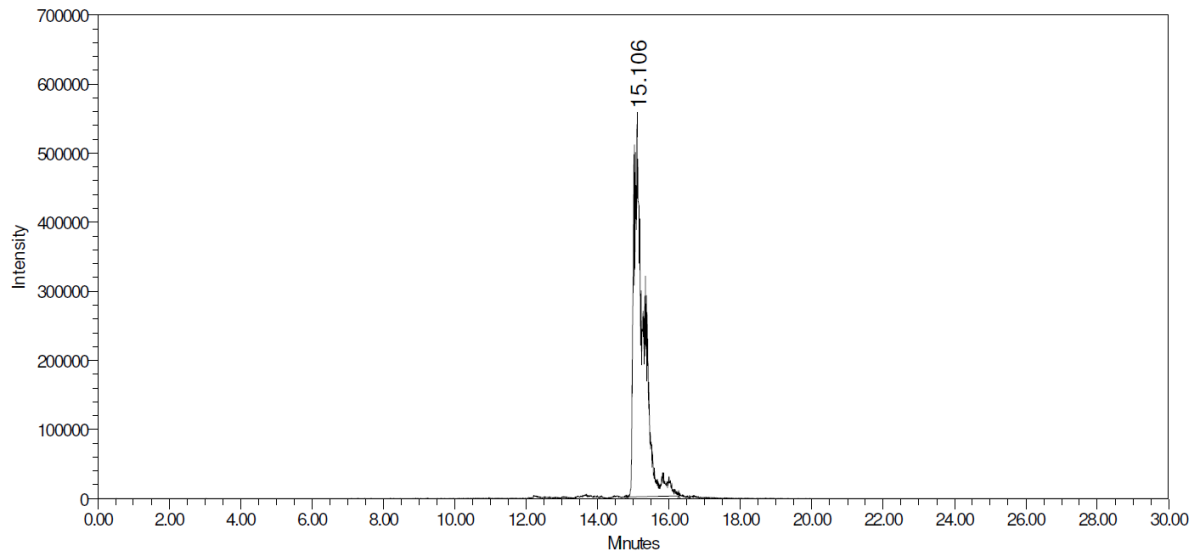
**Figura:** Elaborado pelo autor.

**Figura 37** – Perfil cromatográfico da Fengicina B com  $[M + 2H]^{2+} = 746,4$ .



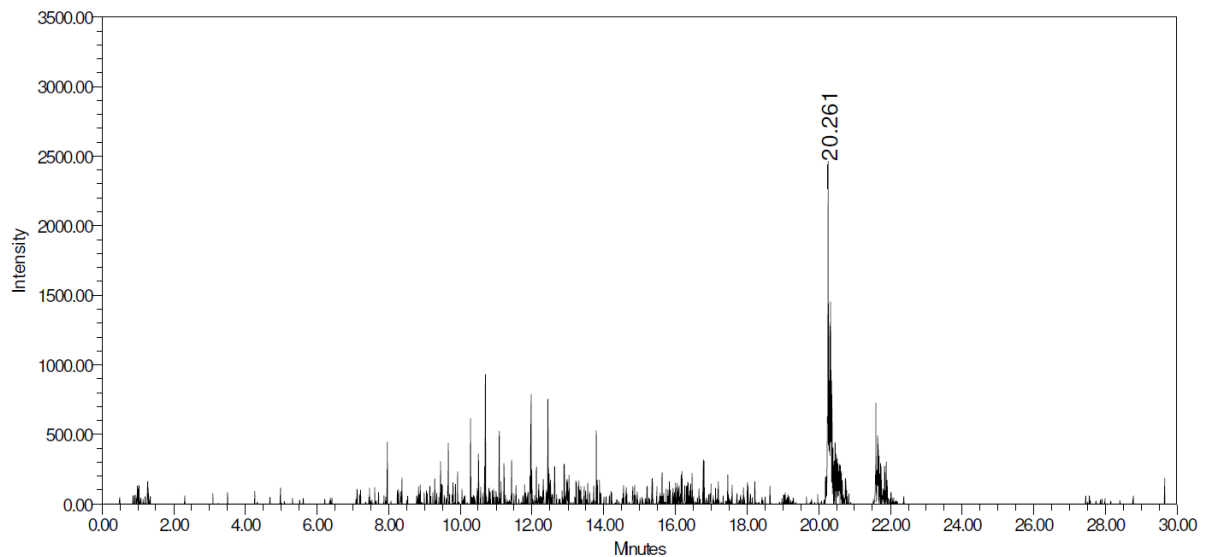
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 38** – Perfil cromatográfico da Fengicina B com  $[M + 2H]^{2+} = 753,4$ .



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 39** – Perfil cromatográfico da Surfactina com  $[M + H]^+ = 1008,4$ .



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

A identificação dos lipopeptídeos presentes nos extratos acetato de etila e lipopeptídeo das amostras analisadas baseou-se na correlação entre os tempos de retenção apresentados nos cromatogramas das amostras em comparação com os cromatogramas padrão. Os dados obtidos na análise pelo método SIM estão expressos na Tabela 7.

**Tabela 7** – Dados obtidos pelo método SIM dos lipopeptídeos presentes nos Extratos Acetato de etila e Lipopeptídeo.

<b>Extrato AcOEt Não-Inoculado</b>				
<b>Lipopeptídeo</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>[M+2H]<sup>2+</sup></b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área</b>
<b>Fengicina A</b>	-	732,4	15,468	41922
<b>Fengicina B</b>	-	746,4	18,278	48888
<b>Fengicina A</b>	-	732,4	19,374	112213
<b>Extrato AcOEt 501 (<i>Bacillus subtilis</i>)</b>				
<b>Lipopeptídeo</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>[M+2H]<sup>2+</sup></b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área</b>
-	-	-	-	-
<b>Extrato AcOEt 502 (<i>Azospirillum sp.</i>)</b>				
<b>Lipopeptídeo</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>[M+2H]<sup>2+</sup></b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área</b>
<b>Fengicina A</b>	-	732,4	15,459	29275
<b>Extrato AcOEt 503 (<i>Azospirillum brasilense</i>)</b>				
<b>Lipopeptídeo</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>[M+2H]<sup>2+</sup></b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área</b>
<b>Fengicina A</b>	-	732,4	15,516	37349
<b>Extrato AcOEt 504 (<i>Azospirillum brasilense</i>)</b>				
<b>Lipopeptídeo</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>[M+2H]<sup>2+</sup></b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área</b>
<b>Fengicina A</b>	-	732,4	15,512	16114
<b>Extrato AcOEt 505 (<i>Bacillus stratosphericus/Bacillus pumilus</i>)</b>				
<b>Lipopeptídeo</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>[M+2H]<sup>2+</sup></b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área</b>
<b>Fengicina A</b>	-	732,4	13,475	354498
<b>Fengicina B</b>	-	739,4	15,405	43511
<b>Extrato AcOEt 506 (<i>Bacillus cereus</i>)</b>				
<b>Lipopeptídeo</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>[M+2H]<sup>2+</sup></b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área</b>
<b>Fengicina B</b>	-	739,4	13,484	150836
<b>Fengicina A</b>	-	732,4	15,423	35950
<b>Extrato AcOEt 507 (<i>Bacillus cereus</i>)</b>				
<b>Lipopeptídeo</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>[M+2H]<sup>2+</sup></b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área</b>
<b>Fengicina B</b>	-	739,4	13,661	81787
<b>Fengicina B</b>	-	746,4	14,051	21235
<b>Fengicina A</b>	-	732,4	15,464	56720
<b>Extrato AcOEt 508 (<i>Bacillus safensis/ Bacillus pumilus</i>)</b>				
<b>Lipopeptídeo</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>[M+2H]<sup>2+</sup></b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área</b>
<b>Fengicina B</b>	-	739,4	13,403	81992
<b>Fengicina B</b>	-	746,4	13,743	42138
<b>Fengicina A</b>	-	732,4	15,347	34667
<b>Extrato AcOEt 510 (<i>Bacillus sp.</i>)</b>				
<b>Lipopeptídeo</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>[M+2H]<sup>2+</sup></b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área</b>
<b>Fengicina B</b>	-	753,4	14,192	25460
<b>Fengicina A</b>	-	732,4	15,462	53309
<b>Extrato AcOEt 511 (<i>Bacillus sp.</i>)</b>				

Lipopeptídeo	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	Tempo de Retenção (min)	Área
Fengicina B	-	739,4	13,624	288318
Fengicina B	-	746,4	15,163	44341
Fengicina A	-	732,4	15,501	32703
<b>Extrato AcOEt 512 (<i>Bacillus sp.</i>)</b>				
Lipopeptídeo	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	Tempo de Retenção (min)	Área
Fengicina A	-	732,4	15,433	82415
<b>Extrato Lipopeptídeo Não-Inoculado</b>				
Lipopeptídeo	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	Tempo de Retenção (min)	Área
Fengicina B	-	746,4	5,581	48902
Fengicina B	-	746,4	5,912	-
<b>Extrato Lipopeptídeo 501 (<i>Bacillus subtilis</i>)</b>				
Lipopeptídeo	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	Tempo de Retenção (min)	Área
Fengicina A	-	718,4	13,324	12045
Fengicina A	-	732,4	14,415	245857
Fengicina B	-	746,4	14,814	128136
Fengicina B	-	739,4	14,845	515007
Fengicina B	-	753,4	15,262	279458
Fengicina A	-	725,4	15,375	117089
<b>Extrato Lipopeptídeo 510 (<i>Bacillus sp.</i>)</b>				
Lipopeptídeo	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	Tempo de Retenção (min)	Área
-	-	-	-	-
<b>Extrato Lipopeptídeo 512 (<i>Bacillus sp.</i>)</b>				
Lipopeptídeo	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	Tempo de Retenção (min)	Área
Fengicina B	-	746,4	15,221	568834
Fengicina B	-	753,4	15,622	661185
Fengicina B	-	739,4	16,114	539775

Fonte: Elaborado pelo autor.

A comparação dos dados obtidos entre extratos das amostras e amostras-padrões de lipopeptídeos permitiu a identificação apenas de lipopeptídeos pertencentes à família das fengicinas. Apesar do extrato acetato de etila não-inoculado mostrar picos nos cromatogramas referentes a Fengicina A ( $[M+2H]^{2+} = 732,4$ ) e a Fengicina B ( $[M+2H]^{2+} = 746,4$  e  $t_r = 18,28$ ), o seu extrato lipopeptídeo não exibe picos concordantes com os tempos de retenção característicos, sugerindo que substâncias contendo a razão  $m/z$  semelhante detectados e não existe quaisquer lipopeptídeo nessas amostras.

O extrato acetato de etila 501, pertencente ao caldo fermentativo inoculado com *Bacillus subtilis*, não apresentou qualquer sinal correspondente aos lipopeptídeos monitorados, porém seu extrato lipopeptídeo evidenciou a presença de 6 diferentes tipos de fengicinas,

Fengicina A ( $[M+2H]^{2+} = 718,4$ ,  $[M+2H]^{2+} = 725,4$ ,  $[M+2H]^{2+} = 732,4$ ) e Fengicina B ( $[M+2H]^{2+} = 739,4$ ,  $[M+2H]^{2+} = 746,4$  e  $[M+2H]^{2+} = 753,4$ ), confirmando a sensibilidade da técnica de precipitação ácida para a extração seletiva de lipopeptídeos.

O extrato lipopeptídeo 510 (*Bacillus sp*) não apresentou qualquer pico compatível com o tempo de retenção característico dos lipopeptídeos analisados, porém o seu extrato acetato de etila mostrou dois picos referentes a Fengicina A ( $[M+2H]^{2+} = 732,4$  e  $t_r = 15,46$ ) e a Fengicina B ( $[M+2H]^{2+} = 753,4$  e  $t_r = 14,19$ ). Infere-se, então, que os picos observados no extrato acetato não correspondem aos lipopeptídeos esperados, uma vez que o extrato lipopeptídeo possui maior sensibilidade e não evidenciou a presença dessas moléculas. Já na amostra 512 (*Bacillus sp*) detectou-se diferentes lipopeptídeos no extrato acetato (Fengicina A,  $[M+2H]^{2+} = 732,4$  e  $t_r = 15,4333$ ) e no extrato lipopeptídeo (Fengicina B,  $[M+2H]^{2+} = 739,4$ ,  $[M+2H]^{2+} = 746,4$  e  $[M+2H]^{2+} = 753,4$ ).

Pela comparação das áreas relativas dos picos obtidos nos extratos lipopeptídeos, é possível inferir acerca da molécula majoritária nas amostras. No extrato lipopeptídeo 501, a Fengicina B com  $[M+2H]^{2+} = 739,4$  apresentou maior área relativa (Área = 515007), enquanto no extrato lipopeptídeo 512, a Fengicina B com  $[M+2H]^{2+} = 753,4$  apresentou maior área relativa (Área = 661185).

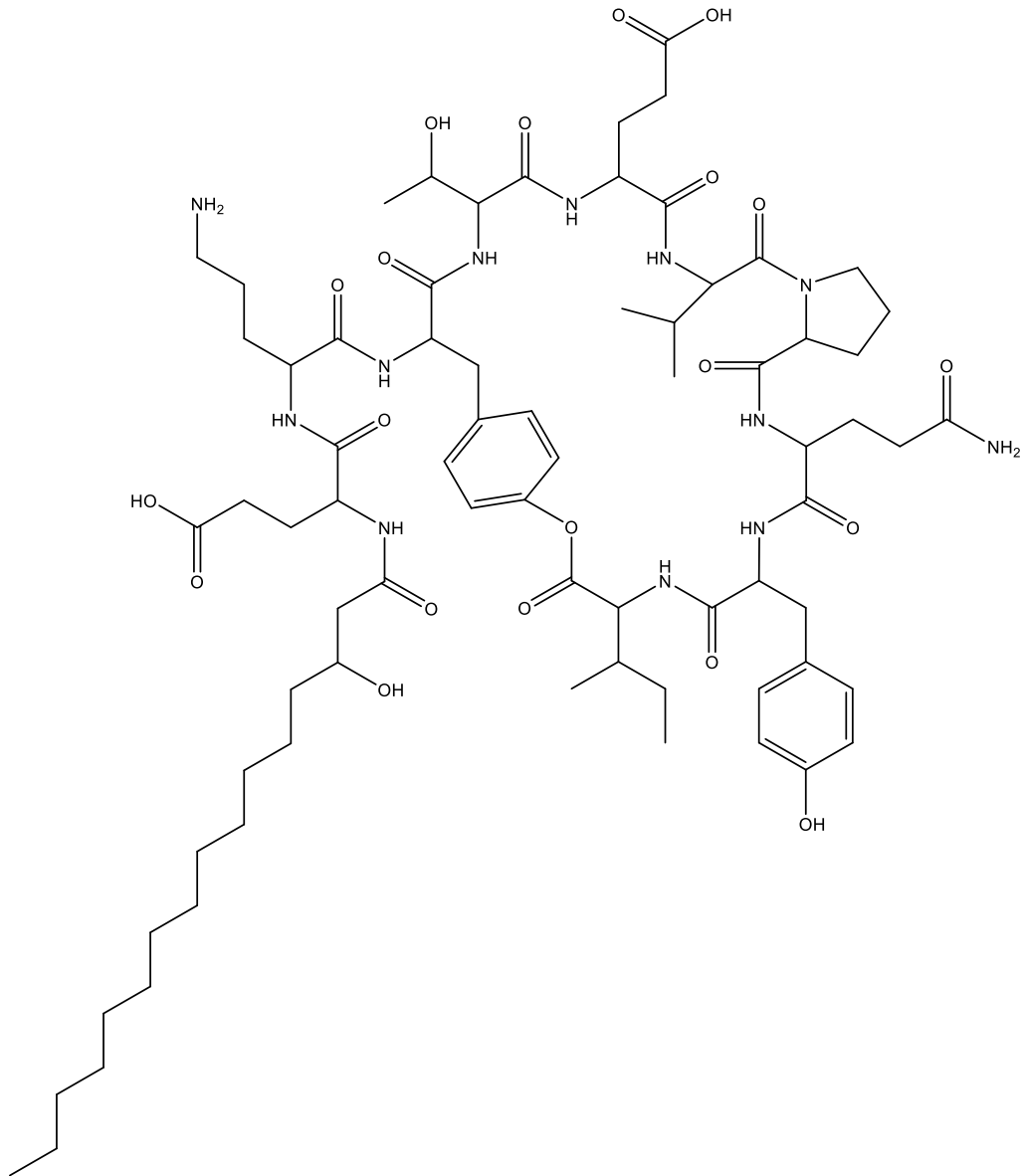
Os cromatogramas referentes à cada lipopeptídeo monitorado em cada amostra estão ilustrados nos Anexos desse trabalho (p. 108-123).

#### **5.4 Caracterização química dos lipopeptídeos majoritários nos extratos lipopeptídeos das amostras 501, 510 e 512**

Os lipopeptídeos majoritários nos extratos lipopeptídeo são Fengicinas B, que apresentam como sequência primária da porção peptídica L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-a Thr-L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile, variando apenas quanto ao comprimento da cadeia de ácido graxo. Na Figura 40 (p. 69) têm-se a estrutura química das Fengicinas B. A Tabela 8 correlaciona os sinais característicos de RMN  $^1H$  relatados para os resíduos de aminoácidos constituintes das fengicinas e os sinais observados experimentalmente para cada extrato lipopeptídeo analisado.



**Figura 40** – Estrutura química da Fengicina B.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Tabela 8** – Deslocamentos químicos dos resíduos de aminoácidos constituintes da Fengicina B nos extratos lipopeptídeo.

Resíduo de aminoácido	Referência* (ppm)	ExtLPNI	ExtLP501	ExtLP510	ExtLP512
<b>Glu1</b>	8,13 (HN)	-	-	8,15	-
	4,3 (H $\alpha$ )	-	4,31	-	4,26
	1,79 (H $\beta$ )	-	1,79	-	-
	1,94 (H $\beta$ )	-	-	-	1,99
	2,27 (H $\gamma$ )	-	2,26	2,29	-
	2,34 (H $\gamma$ )	-	2,32	2,31	-
<b>Orn2</b>	8,31 (HN)	-	-	8,31	8,3
	4,38 (H $\alpha$ )	-	4,36	-	-
	1,60 (H $\beta$ )	-	1,59	1,6	-
	1,80 (H $\gamma$ )	1,81	1,79	-	-
	2,84 (H $\delta$ )	2,86	2,83	-	-
	7,69 (H $\epsilon$ )	-	-	-	-
<b>Tyr3</b>	8,17 (HN)	-	-	8,17	-
	4,51 (H $\alpha$ )	-	-	-	-
	2,87 (H $\beta$ )	2,86	-	-	-
	3,02 (H $\beta$ )	3,02	3,02	-	-
	7,22 (H $\delta$ )	-	-	7,22	7,24
	6,99 (H $\epsilon$ )	-	-	-	-
<b>aThr4</b>	7,78 (HN)	-	-	-	-
	3,99 (H $\alpha$ )	3,97	3,98	-	-
	3,55 (H $\beta$ )	-	3,55	3,51	-
	0,80 (H $\gamma$ 2)	-	0,81	0,83	0,83
<b>Glu5</b>	7,69 (HN)	-	-	-	-
	4,18 (H $\alpha$ )	4,19	-	-	-

	1,96 (H $\beta$ )	1,98	1,97	-	1,99
	2,28 (H $\gamma$ )	-	2,26	2,29	-
<b>Val6</b>	8,30 (HN)	-	-	8,3	8,3
	4,50 (H $\alpha$ )	-	-	-	-
	2,10 (H $\beta$ )	2,11	2,1	-	2,14
	0,91 (H $\gamma$ )	-	-	0,91	0,91
	-	-	-	-	-
<b>Pro7</b>	4,30 (H $\alpha$ )	4,31	4,31	-	4,26
	2,13 (H $\beta$ )	-	2,15	-	2,15
	1,78 (H $\gamma$ )	-	1,79	-	-
	1,83 (H $\gamma$ )	1,81	-	-	-
	3,5 (H $\delta$ )	3,51	3,5	3,51	-
	7,94 (HN)	-	-	7,96	7,93
<b>Gln8</b>	4,20 (H $\alpha$ )	4,19	-	-	-
	1,76 (H $\beta$ )	-	-	-	-
	2,24 (H $\gamma$ )	-	2,26	2,24	-
	7,34 (H $\epsilon$ 2)	7,35	7,34	7,34	7,34
	6,84 (H $\epsilon$ )	-	-	-	-
	7,95 (HN)	-	-	7,96	7,97
<b>Tyr9</b>	4,71 (H $\alpha$ )	4,69	-	-	-
	2,87 (H $\beta$ )	2,86	-	-	-
	7,05 (H $\delta$ )	-	-	7,05	-
	6,69 (H $\epsilon$ )	-	-	-	-
	8,76 (HN)	-	-	8,78	-
<b>Ile10</b>	4,05 (H $\alpha$ )	-	-	-	-
	1,84 (H $\beta$ )	-	-	-	-
	0,94 (H $\gamma$ 21)	0,95	-	0,94	0,94

---

0,86 (H811)	0,85	0,87	0,87	0,85
-------------	------	------	------	------

---

\*Referência: (NAM *et al.*, 2015)

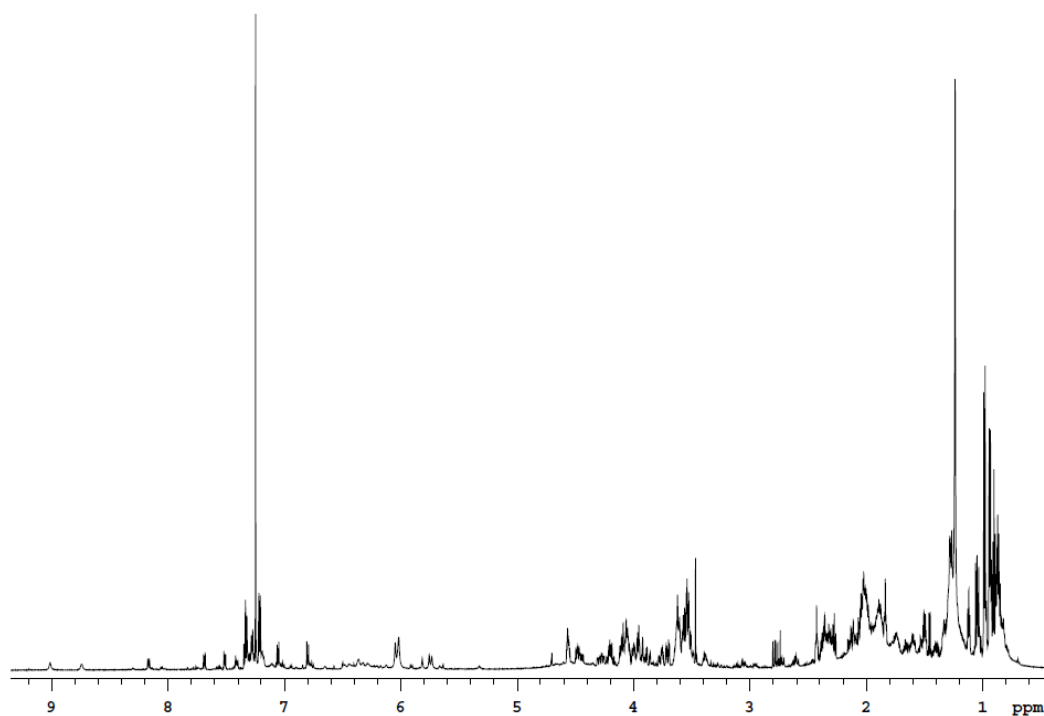
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os dados do UPLC-QDA-SIM dos extratos acetato de etila e lipopeptídeo da amostra não-inoculada, assim como a ausência dos sinais de RMN  $^1\text{H}$  característicos dos aminoácidos reportados na Tabela 8, indica que esses respectivos caldos fermentativos não apresentam lipopeptídeos no meio. Por outro lado, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do extrato lipopeptídeo das amostras 501, 510 e 512 indicaram vários sinais que podem ser atribuídos aos aminoácidos constituintes da fengicina B, tal qual está expresso na Tabela 9. Devido à complexidade dos extratos acetato de etila, pela presença de várias substâncias ainda não identificadas, não foi possível identificar a maioria dos sinais reportados para os aminoácidos de interesse, portanto, não foram contemplados na Tabela 8.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos lipopeptídeos das amostras 501 (*Bacillus subtilis*), 510 (*Bacillus sp.*) e 512 (*Bacillus sp.*) apresentaram sinais de 0,9 a 7,1 ppm característicos dos aminoácidos presentes na Fengicina B. Os hidrogênios aromáticos presentes na tirosina aparecem na forma de dubleto (d) na faixa de  $\delta\text{H}$  6,88 – 7,17, correspondente aos hidrogênios 2, 3, 5 e 6. Esses sinais referentes à tirosina apresentam boa intensidade nos espectros do ExtLP501 e ExtLP510, apesar de não serem significativos no espectro do ExtLP-512. Os hidrogênios nos carbonos  $\alpha$ -carbonila dos aminoácidos apontados indicaram deslocamentos químicos entre 3,58 – 4,12 ppm nas formas de dubleto (d) ou tripleto (t), presentes nos espectros ExtLP501, ExtLP510 e ExtLP512.

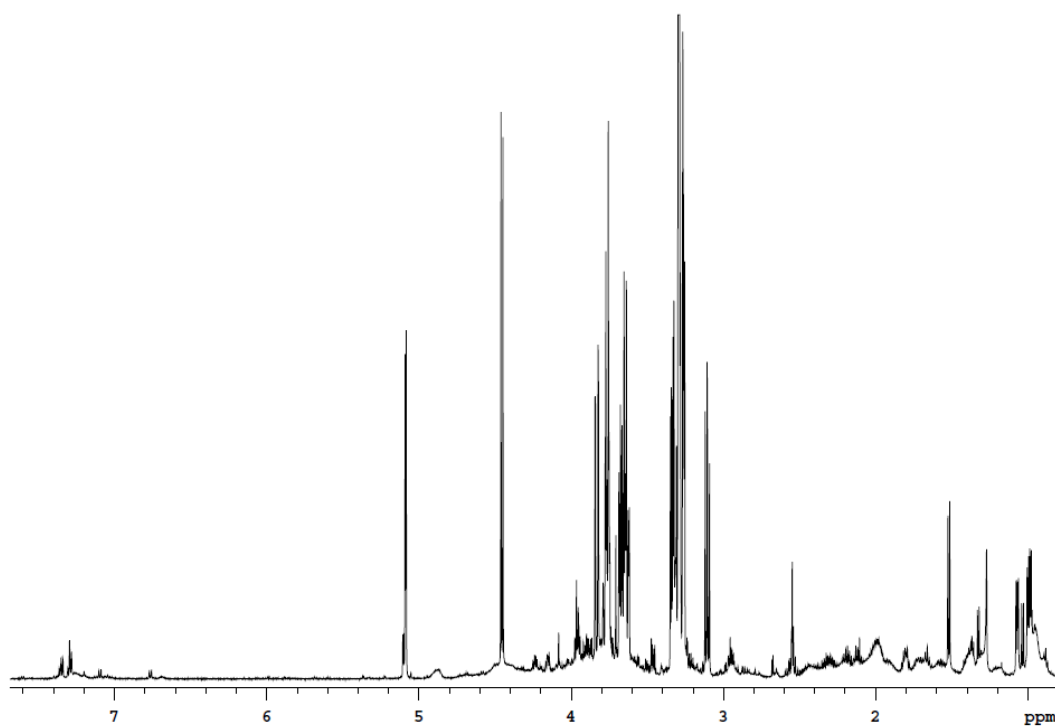
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos acetato e lipopeptídeo das amostras Não-Inoculado, 501, 510 e 512 estão expressos nas figuras a seguir.

**Figura 41** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] do ExtAcOEtNI



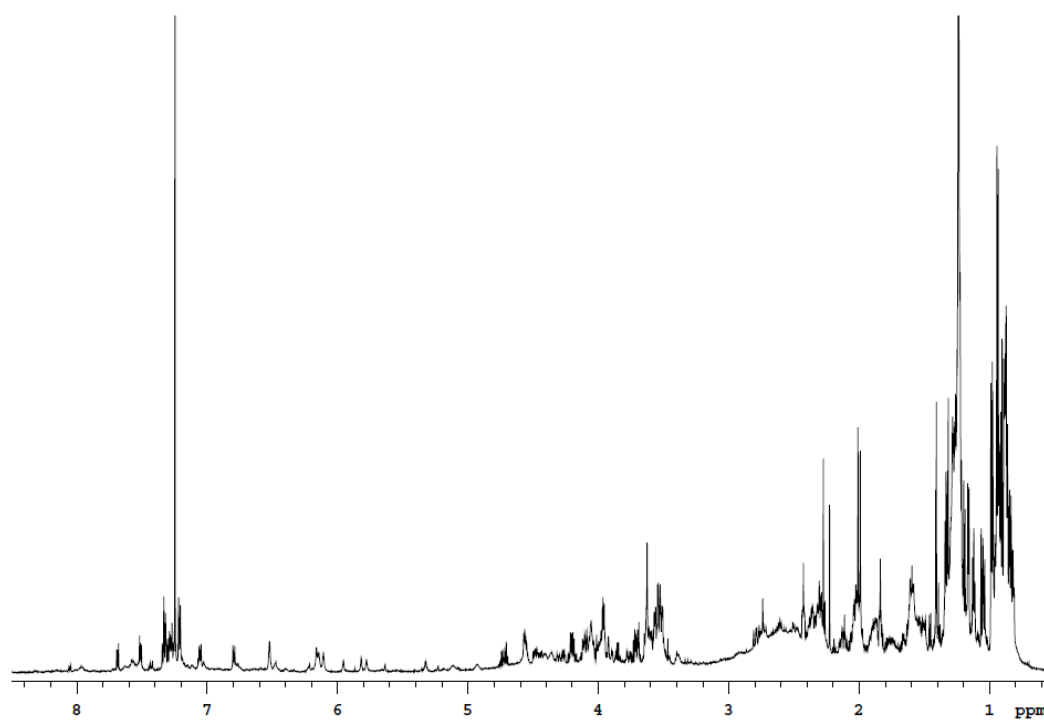
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 42** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] do ExtLPNI.



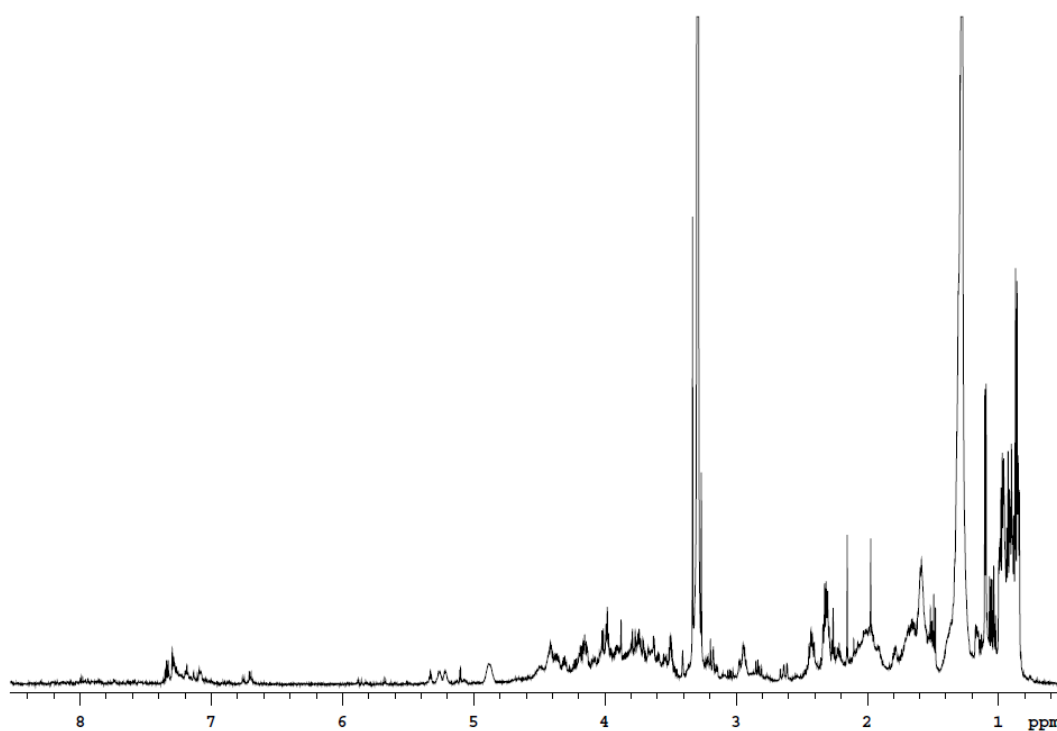
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 43** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] do ExtAcOEt501.



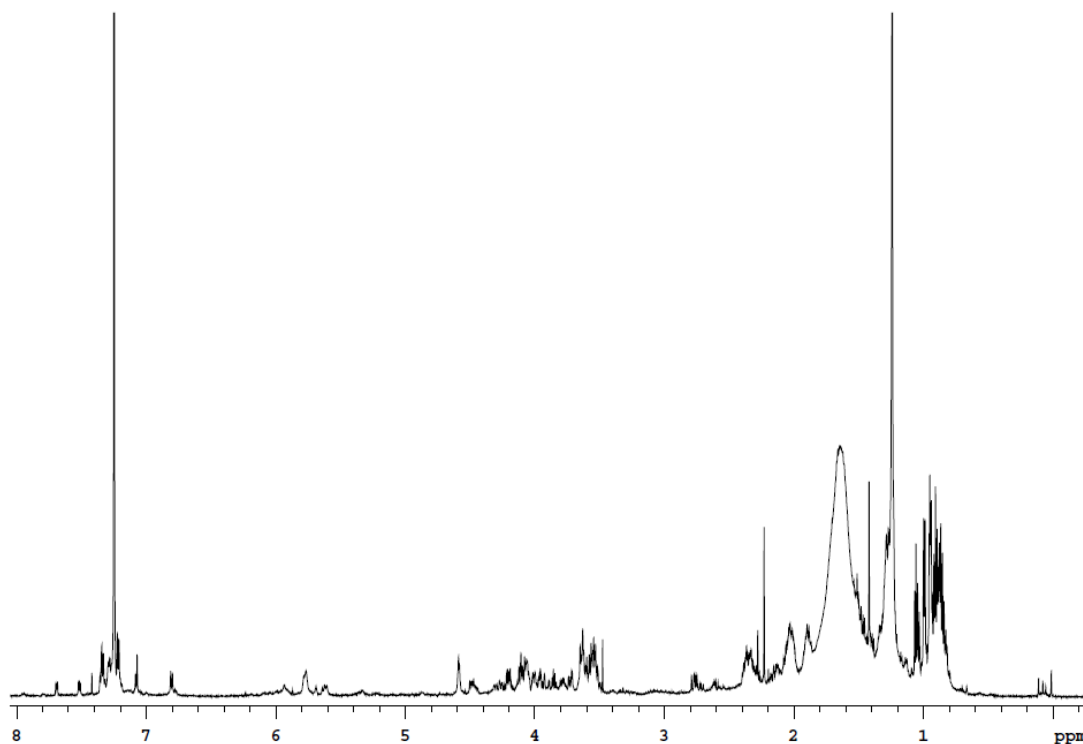
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 44** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] do ExtLP501.



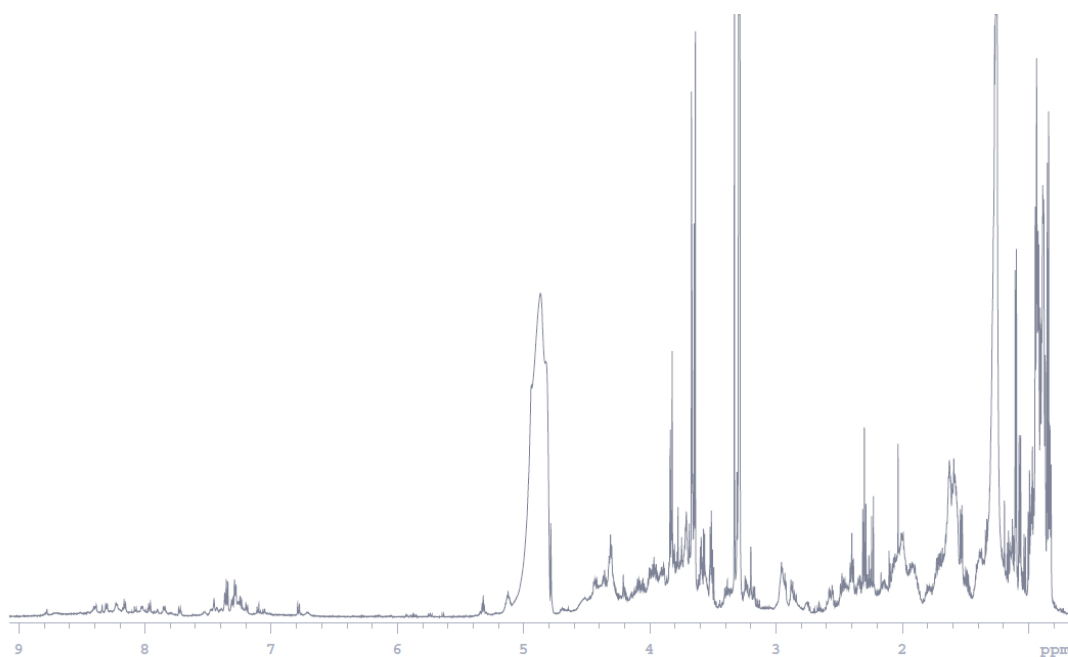
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 45** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] do ExtAcOEt510.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

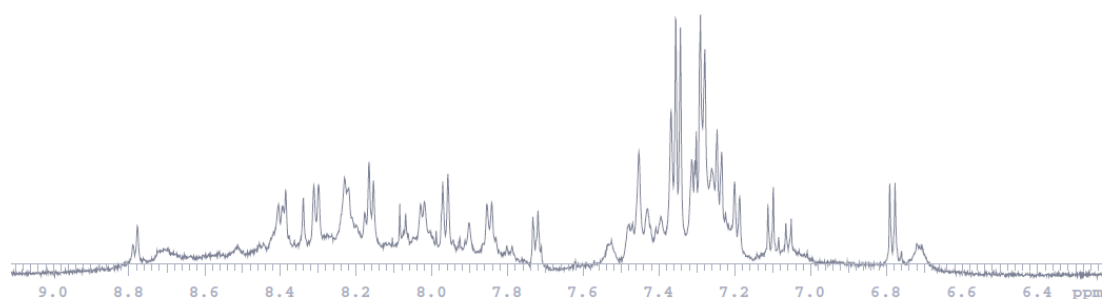
**Figura 46** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] do ExtLP510.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

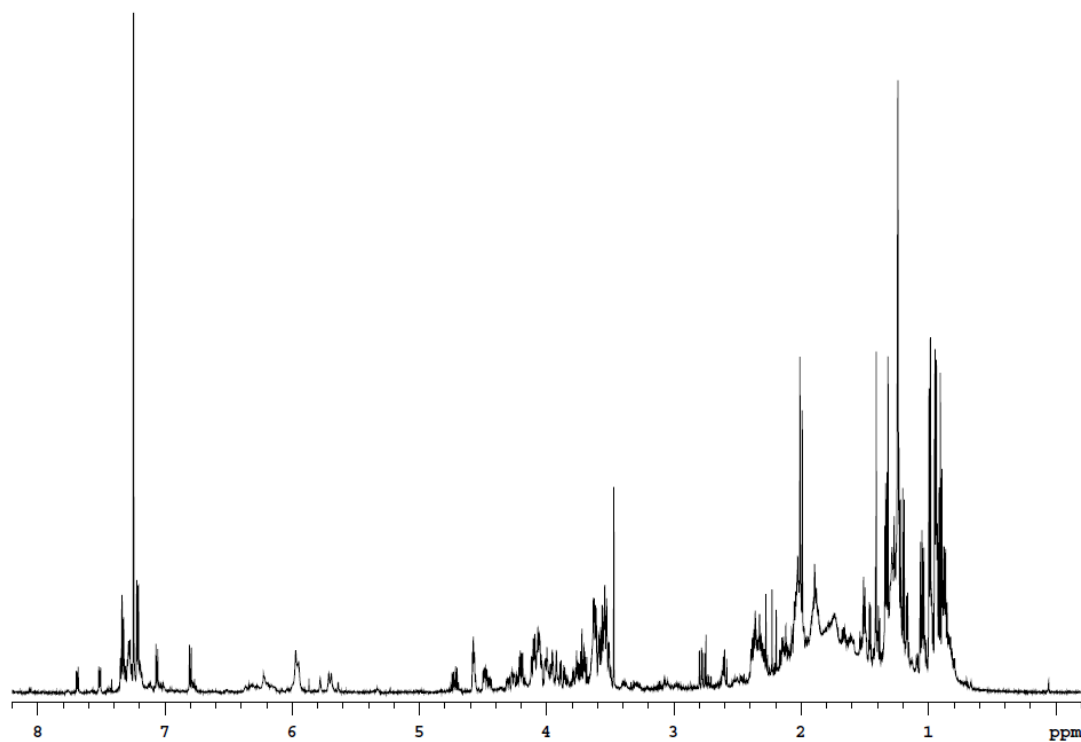


**Figura 47** – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] do ExtLP510.



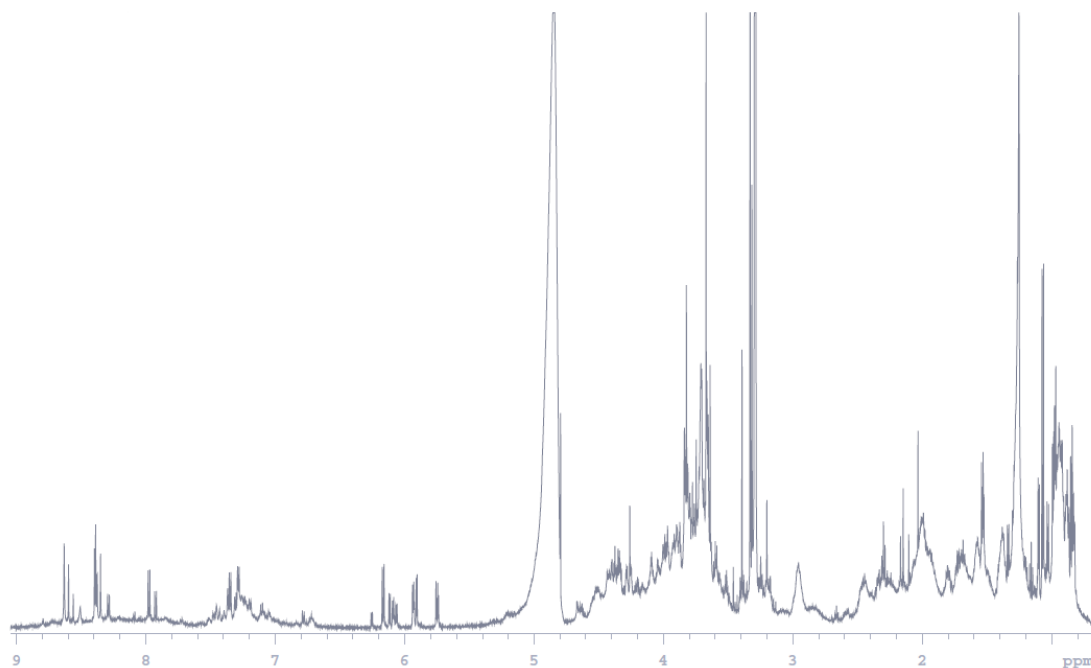
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 48** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] do ExtAcOEt512.



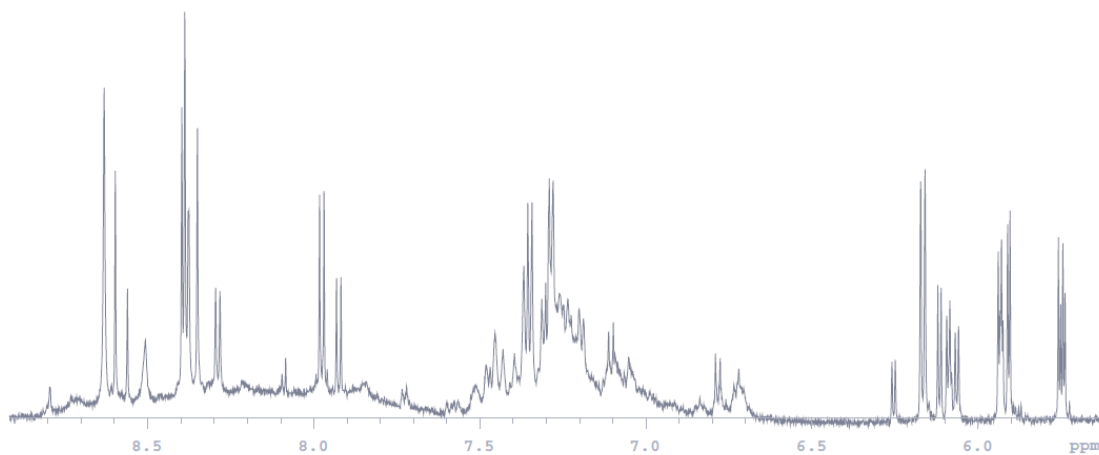
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 49** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] do ExtLP512.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 50** – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ] do ExtLP512.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

## 6 CONCLUSÃO

As técnicas de partição líquido-líquido e precipitação ácida permitiram a obtenção dos extratos acetato de etila e lipopeptídeo, respectivamente, para as amostras de caldo fermentado livre de células NI (não-inoculado), 501 (*Bacillus subtilis*), 502 (*Azospirillum sp.*), 503 (*Azospirillum brasilense*), 504 (*Azospirillum brasilense*), 505 (*Bacillus stratosphericus/Bacillus pumilus*), 506 (*Bacillus cereus*), 507 (*Bacillus cereus*), 508 (*Bacillus safensis/Bacillus pumilus*), 510 (*Bacillus sp.*), 511 (*Bacillus sp.*) e 512 (*Bacillus sp.*). Tendo maiores rendimentos observados nos extratos acetato de etila 503, com 0,0193%, e extrato lipopeptídeo 501, com 0,0490%.

Os estudos cromatográficos permitiram a elaboração dos perfis químicos dos extratos trabalhados, assim como a identificação de 9 metabólitos secundários com propriedades biológicas de interesse na agroindústria: ciclo(D-Pro-D-Leu), ciclo(D-Trp-L-Pro), ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-D-Phe), fosfatidiletanolamina, 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoaxi-3H(4H)-ona, N-óxido de 2-nonil-4-hidroxiquinolina, lipoamida B, hidroxipalmitoil esfingalina. Assim como os experimento a partir do UPLC-QDA-SIM possibilitaram o monitoramento das famílias de lipopeptídeos presentes nos extratos seletivos para essas classes de substâncias.

Através da Ressonância Magnética Nuclear dos extratos lipopeptídeos, pode-se caracterizar os lipopeptídeos majoritários, pertencentes a classe das fengicinas, com base nos sinais característicos de  $^1\text{H}$  e multiplicidades dos seus aminoácidos constituintes.

Tendo em vista os resultados obtidos, observa-se a necessidade do aprofundamento no estudo dos metabólitos secundários bioativos produzidos por micro-organismos do gênero *Bacillus* e *Azospirillum*, além da investigação de novas fontes biológicas de produção de lipopeptídeos, a fim de otimizar os cultivos de bananeiras através das propriedades de biocontrole que essas substâncias possuem.

## REFERÊNCIAS

- ABRIOUEL, Hikmate; FRANZ, Charles M.A.P.; OMAR, Nabil Ben; GÁLVEZ, Antonio. Diversity and applications of Bacillus bacteriocins. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 35, n. 1, p. 201-232, jan. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>.
- AHMAD, Shakoor *et al.* Benzoxazinoid Metabolites Regulate Innate Immunity against Aphids and Fungi in Maize. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 157, n. 1, p. 317-327, 5 jul. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.111.180224>.
- AJESH, K.; SUDARSLAL, S.; ARUNAN, C.; SREEJITH, K.. Kannurin, a novel lipopeptide from Bacillus cereus strain AK1: isolation, structural evaluation and antifungal activities. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 115, n. 6, p. 1287-1296, 2 set. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12324>.
- ALETI, Gajender; SESSITSCH, Angela; BRADER, Günter. Genome mining: prediction of lipopeptides and polyketides from bacillus and related firmicutes. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 13, p. 192-203, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2015.03.003>.
- AMORIM, Edna Peixoto da Rocha; MELO, Itamar Soares de. Ação antagônica de rizobactérias contra Phytophthora parasítica e P. citrophthora e seus efeitos no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 24, p. 565-568, 2002.
- ANANDHAM, Rangasamy; HEO, Jun; KRISHNAMOORTHY, Ramasamy; SENTHILKUMAR, Murugaiyan; GOPAL, Nellaiappan Olgaganathan; KIM, Soo-Jin; KWON, Soon-Wo. Azospirillum ramasamyi sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from fermented bovine products. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 69, n. 5, p. 1369-1375, 1 maio 2019. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003320>.
- ARIMA, Kei; KAKINUMA, Atsushi; TAMURA, Gakuzo. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by Bacillus subtilis: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 31, n. 3, p. 488-494, maio 1968. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291x\(68\)90503-2](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291x(68)90503-2).
- AWAD, Hassan M.; EL-SHAHED, Kamal Y. I.; AZIZ, Ramlan; SARMIDI, Mohamed Roji; EL-ENSHASY, Hesham A.. Antibiotics as Microbial Secondary Metabolites: production and application. **Jurnal Teknologi**, [s.l.], v. 59, n. 1, p. 101-111, 15 set. 2012. Penerbit UTM Press. <http://dx.doi.org/10.11113/jt.v59.1593>.
- AWAIS, M.; PERVEZ, A.; YAQUB, A.; SHAH, M. M. Production of Antimicrobial Metabolites by Bacillus subtilis Immobilized in Polyacrylamide Gel. **Pakistan J. Zool.**, Pakistan, v. 42, n. 3, p. 267-275, 2010.
- BALASUNDARAM, B.; HARRISON, S.T.L.. Influence of the extent of disruption of Bakers' yeast on protein adsorption in expanded beds. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 133, n. 3,

p. 360-369, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.724>.

BALDANI, José I.; BALDANI, Vera L.D.. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 77, n. 3, p. 549-579, set. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0001-37652005000300014>.

BANCHIO, Erika; BOGINO, Pablo C.; SANTORO, Maricel; TORRES, Lorena; ZYGADLO, Julio; GIORDANO, Walter. Systemic Induction of Monoterpene Biosynthesis in *Origanum × majoricum* by Soil Bacteria. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 58, n. 1, p. 650-654, 11 dez. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf9030629>.

BERRUE, Fabrice; IBRAHIM, Abdelnasser; BOLAND, Patricia; KERR, Russell G.. Newly isolated marine *Bacillus pumilus* (SP21): a source of novel lipoamides and other antimicrobial agents. **Pure And Applied Chemistry**, [s.l.], v. 81, n. 6, p. 1027-1031, 5 maio 2009. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1351/pac-con-08-09-25>.

BESSON, Françoise; PEYPOUX, Françoise; MICHEL, Georges; DELCAMBE, Lucien. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. **The Journal Of Antibiotics**, [s.l.], v. 31, n. 4, p. 284-288, 1978. Japan Antibiotics Research Association. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.31.284>.

BORGES, A. L.; PROFETA, T. de S.; SANTOS, J. C. de S.; LEDO, C. A. de S. **Crescimento e produção de cultivares de bananeira sob manejo orgânico do solo com duas coberturas vegetais**. 1. ed. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2022. 31 p. ISSN 1809-5003. Disponível em: <http://www.infoteca.cnqia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1142630>. Acesso em: 21 junho 2022.

BRAMER, S. E. VAN. Introduction to mass spectrometry. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 11, n. 3, p. 124-125, 1986

CASSÁN, Fabricio; DIAZ-ZORITA, Martín. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. **Soil Biology And Biochemistry**, [s.l.], v. 103, p. 117-130, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>.

CASSÁN, Fabricio *et al.* Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology And Fertility Of Soils**, [s.l.], v. 56, n. 4, p. 461-479, maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>.

CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J.; ETCHEVERRY, M. In vitro influence of bacterial mixtures on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production: effect of seeds treatment on maize root colonization. **Letters In Applied Microbiology**, [s.l.], v. 41, n. 5, p. 390-396, nov. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2005.01785.x>.

CAO, Yun; XU, Zhihui; LING, Ning; YUAN, Yujuan; YANG, Xingming; CHEN, Lihua; SHEN, Biao; SHEN, Qirong. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B.*

subtilis SQR 9 for suppressing Fusarium wilt of cucumber. **Scientia Horticulturae**, [S.L.], v. 135, p. 32-39, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.12.002>.

CHANDRASEKARAN, Rajamanickam; REVATHI, Kannan; THANIGAIVEL, Annamalai; KIRUBAKARAN, Suyambulingam Arunachalam; SENTHIL-NATHAN, Sengottayan. *Bacillus subtilis* chitinase identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight/time of flight mass spectrometry has insecticidal activity against *Spodoptera litura* Fab. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [s.l.], v. 116, p. 1-12, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.09.013>.

CORREA, E. B.; BETTIOL, W. Controle da podridão de raiz e promoção de crescimento em alface hidropônica com bactérias Gram positivas. Anais, IX. **Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças em Plantas**, Campinas, SP. 2007. (Resumo)

D'AGOSTINO, Fabiana; MORANDI, Marcelo Augusto Boechat. Análise da Viabilidade Comercial de Produtos à Base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para o Controle de Fitopatógenos no Brasil. In: BETTIOL, W; MORANDI, A. B. **Biocontrole de Doenças de Planta: Uso e Perspectivas**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. Cap. 20.

DALMÁZIO, I. **Aplicação da Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray no Monitoramento de Processos Oxidativos Avançados de Interesse Ambiental: Degradação de Fármacos, Avaliação de Sistemas Oxidativos e Oxidação do Isopreno**. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2007

DAVIS, D.A; LYNCH, H.C; VARLEY, J. The application of foaming for the recovery of Surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 28, n. 4-5, p. 346-354, mar. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229\(00\)00327-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00327-6).

DAY, J.M.; DÖBEREINER, Johanna. Physiological aspects of N<sub>2</sub>-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. **Soil Biology And Biochemistry**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 45-50, jan. 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(76\)90020-1](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(76)90020-1).

DELCAMBE, L.. L'Iturine. I. Préparation, Purification et Poids Moléculaire. **Bulletin Des Sociétés Chimiques Belges**, [s.l.], v. 74, n. 7-8, p. 315-328, 2 set. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bscb.19650740704>.

DEY, Goutam *et al.* Marine lipopeptide Iturin A inhibits Akt mediated GSK3 $\beta$  and FoxO3a signaling and triggers apoptosis in breast cancer. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 10316, 14 maio 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep10316>.

DHANARAJAN, G.; RANGARAJAN, V.; SEN, R. Dual gradient macroporous resin column chromatography for concurrent separation and purification of three families of marine bacterial lipopeptides from cell free broth. **Separation and Purification Technology**, [s.l.], v. 143, p. 72–79, 2015.

EEMAN, Marc *et al.* Interaction of fengycin with stratum corneum mimicking model membranes: a calorimetry study. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 121, p. 27-35, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.019>.

ESHITA, Steven M.; ROBERTO, Nick H.; BEALE, John M.; MAMIYA, Blain M.; WORKMAN, Ryan F.. Bacillomycin Lc, a New Antibiotic of the Iturin Group: isolation, structures, and antifungal activities of the congeners.. **The Journal Of Antibiotics**, [s.l.], v. 48, n. 11, p. 1240-1247, 1995. Japan Antibiotics Research Association. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.48.1240>.

FIGUEIREDO, J. E. F.; TEIXEIRA, M. A.; LIMA, G. V. C.; QUINTAO, P. L.; CORREA, J.; A.; BRESSAN W.; PINTO, N. F. J.; CASELA, C. R. Atividade antagonista da bactéria endofítica CNPMS22 contra fungos de sementes do milho (*Zea mays*). **Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, [s.l.], v. 28, p. 659–666, 2010.

GAN, Ping *et al.* Bacillus- produced surfactin attenuates chronic inflammation in atherosclerotic lesions of ApoE  $-/-$  mice. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 35, p. 226-234, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2016.03.043>.

GARCIA, David e; BAIDOO, Edward e; BENKE, Peter I; PINGITORE, Francesco; TANG, Yinjie J; VILLA, Sandra; KEASLING, Jay D. Separation and mass spectrometry in microbial metabolomics. **Current Opinion In Microbiology**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 233-239, jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008.04.002>.

HALKET, John M.; WATERMAN, Daniel; PRZYBOROWSKA, Anna M.; PATEL, Raj K. P.; FRASER, Paul D.; BRAMLEY, Peter M.. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. **Journal Of Experimental Botany**, [s.l.], v. 56, n. 410, p. 219-243, 20 dez. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eri069>.

HAMDACHE, Ahlem; LAMARTI, Ahmed; ALEU, Josefina; COLLADO, Isidro G. Non-peptide Metabolites from the Genus *Bacillus*. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 74, n. 4, p. 893-899, 14 mar. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np100853e>.

HARRIS, D. C.. **Quantitative chemical analysis**. 8. ed. Nova York: W. H. Freeman And Company, 2010

HUANG, H. H. C. Biological control of soil-borne diseases in Canada. *In: International Symposium on Clean Agriculture, Sapporo: OECD*, p. 52-59. 1997.

JACQUES, Philippe. Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. **Microbiology Monographs**, [s.l.], p. 57-91, 20 set. 2010. Springer Berlin Heidelberg. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5_3).

KASPAR, Felix; NEUBAUER, Peter; GIMPEL, Matthias. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 82, n. 7, p. 2038-2053, 9 jul. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00110>.

- KAWAGOE, Yumi *et al.* Cyclic lipopeptide iturin A structure-dependently induces defense response in Arabidopsis plants by activating SA and JA signaling pathways. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 460, n. 4, p. 1015-1020, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.143>.
- KHAN, Mohammad Sayyar; GAO, Junlian; ZHANG, Mingfang; CHEN, Xuqing; MOE, The Su; DU, Yunpeng; YANG, Fengping; XUE, Jing; ZHANG, Xiuhai. Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic bacteria *Bacillus stratosphericus* LW-03 from *Lilium wardii*. **3 Biotech**, [s.l.], v. 10, n. 7, p. 305, 15 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-020-02294-2>.
- KORENBLUM, Elisa; AHARONI, Asaph. Phytobiome metabolism: beneficial soil microbes steer crop plants' secondary metabolism. **Pest Management Science**, [s.l.], v. 75, n. 9, p. 2378-2384, 13 maio 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.5440>.
- KUMAR, Sasidharan Nishanth; NAMBISAN, Bala; SUNDARESAN, Andikkannu; MOHANDAS, Chellapan; ANTO, Ruby John. Isolation and identification of antimicrobial secondary metabolites from *Bacillus cereus* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. **Annals Of Microbiology**, [s.l.], v. 64, n. 1, p. 209-218, 21 maio 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-013-0653-6>.
- LANDY, M.; WARREN, G. H.; ROSENMANM, S. B.; COLIO, L. G.. Bacillomycin: an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. **Experimental Biology And Medicine**, [s.l.], v. 67, n. 4, p. 539-541, 1 abr. 1948. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.3181/00379727-67-16367>.
- LEE, Yong Seong; KIM, Kil Yong. Antagonistic Potential of *Bacillus pumilus* L1 Against Root-Knot Nematode, *Meloidogyne arenaria*. **Journal Of Phytopathology**, [s.l.], v. 164, n. 1, p. 29-39, 25 jun. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.12421>.
- LIU, Qiang *et al.* Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 93, p. 31-37, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.08.023>.
- LUZ, W. C. Controle microbiológico do mal-do-pé do trigo pelo tratamento de sementes. **Fitopatologia Brasileira**, [s.l.], v. 13, p. 82-85, 1993a.
- LUZ, W. C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, [s.l.], v. 1, p. 33-77, 1993b.
- LUZYANIN, K.; ABRANTES, M. Ressonância Magnética Nuclear - Ferramenta Versátil em Química Farmacêutica e Imagiologia Médica. **Química, Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 117, n. 2, p. 25-30, 2010.
- MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Controle Alternativo de Fungos. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle Alternativo de Pragas e Doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM/UFV, 2005. p. 269-294.



MASHEGO, Mlawule R.; RUMBOLD, Karl; MEY, Marjan de; VANDAMME, Erick; SOETAERT, Wim; HEIJNEN, Joseph J.. Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 29, n. 1, p. 1-16, 8 nov. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-006-9218-0>.

MEENA, Khem Raj; KANWAR, Shamsher S.. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: applications in food safety and therapeutics. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2015, p. 1-9, 2015. Hindawi Limited

MELO, I. S. de; VALIRINI, P. J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agricola**, [s.l.], v. 52, p. 326-330, 1995.

MHAMMEDI, Aicha; PEYPOUX, Françoise; BESSON, Françoise; MICHEL, Georges. Bacillomycin F, a new antibiotic of iturin group: isolation and characterization.. **The Journal Of Antibiotics**, [s.l.], v. 35, n. 3, p. 306-311, 1982. Japan Antibiotics Research Association. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.35.306>.

MING, Li-June; EPPERSON, Jon D. Metal binding and structure–activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 91, n. 1, p. 46-58, jul. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0162-0134\(02\)00464-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0162-0134(02)00464-6).

MISHRA, Ravi P. N.; SINGH, Ramesh K.; JAISWAL, Hemant K.; KUMAR, Vinod; MAURYA, Sudarshan. Rhizobium-Mediated Induction of Phenolics and Plant Growth Promotion in Rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 5, p. 383-389, 1 abr. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-005-0296-3>.

MONDOL, Muhammad; SHIN, Hee; ISLAM, Mohammad. Diversity of Secondary Metabolites from Marine *Bacillus* Species: chemistry and biological activity. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 11, n. 8, p. 2846-2872, 12 ago. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md11082846>.

NAM, Jiyoung *et al.* Isolation and NMR Analysis of Antifungal Fengycin A and B from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BC32-1. **Bulletin Of The Korean Chemical Society**, [s.l.], v. 36, n. 5, p. 1316-1321, 22 abr. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bkcs.10250>.

OKON, Yaacov; LABANDERA-GONZALEZ, Carlos A.. Agronomic applications of *azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology And Biochemistry**, [s.l.], v. 26, n. 12, p. 1591-1601, dez. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90311-5](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(94)90311-5).

PALAZZINI, Juan M.; DUNLAP, Christopher A.; BOWMAN, Michael J.; CHULZE, Sofia N.. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 192, p. 30-36, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.002>.

- PARK, Sun Young; KIM, Ji-Hee; LEE, Sang Joon; KIM, Younghee. Surfactin exhibits neuroprotective effects by inhibiting amyloid  $\beta$ -mediated microglial activation. **Neurotoxicology**, [s.l.], v. 38, p. 115-123, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2013.07.004>.
- PATHAK, Khyati V. *et al.* Lipopeptides from the Banyan Endophyte, *Bacillus subtilis* K1: mass spectrometric characterization of a library of fengycins. **Journal Of The American Society For Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 23, n. 10, p. 1716-1728, 31 jul. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1007/s13361-012-0437-4>.
- PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G.. **Introdução a Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PEREZ-FONS, Laura; BRAMLEY, Peter M.; FRASER, Paul D.. The optimisation and application of a metabolite profiling procedure for the metabolic phenotyping of *Bacillus* species. **Metabolomics**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 77-90, 4 jun. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-013-0553-6>.
- PEREZ, L. E. P. Metabolismo Secundário. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, São Paulo, p. 1-10, 2004.
- PIEDRAHÍTA-AGUIRRE, César Augusto; ALEGRE, Ranulfo Monte. Production of lipopeptide iturin a using novel strain *Bacillus* iso 1 in a packed bed bioreactor. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 154-158, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.11.004>.
- RAUBITSCHKE, F.; DOSTROVSKY, A.. An Antibiotic Active against Dermatophytes, Derived from *Bacillus Subtilis*. **Dermatology**, [s.l.], v. 100, n. 1, p. 45-49, 1950. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000257151>.
- REIS, Veronica Massena; BALDANI, Vera Lucia Divan; BALDANI, José Ivo. Isolation, Identification and Biochemical Characterization of *Azospirillum* spp. and Other Nitrogen-Fixing Bacteria. **Handbook For Azospirillum**, [s.l.], p. 3-26, 2015. Springer International Publishing. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_1).
- REYNDERS, L.; VLASSAK, K.. Conversion of tryptophan to indoleacetic acid by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biology And Biochemistry**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 547-548, jan. 1979. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(79\)90016-6](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(79)90016-6).
- RONG, Songhao; XU, Hong; LI, Lihua; CHEN, Rongjun; GAO, Xiaoling; XU, Zhengjun. Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [s.l.], v. 162, p. 69-77, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.09.003>.
- SHARMA, Abhishek; MEENA, Khem Raj; KANWAR, Shamsheer S.. Molecular characterization and bioinformatics studies of a lipase from *Bacillus thermoamylovorans* BHK67. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 107, p. 2131-2140, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.092>.

SILVA, Máira Taynara Santos da *et al.* Integral production and concentration of surfactin from *Bacillus* sp. ITP-001 by semi-batch foam fractionation. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 104, p. 91-97, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.04.010>.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7.ed. Rio de Janeiro, LTC Editora, 2007.

SOGA, Tomoyoshi; OHASHI, Yoshiaki; UENO, Yuki; NARAOKA, Hisako; TOMITA, Masaru; NISHIOKA, Takaaki. Quantitative Metabolome Analysis Using Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. **Journal Of Proteome Research**, [s.l.], v. 2, n. 5, p. 488-494, 28 jun. 2003. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/pr034020m>.

SOUZA, Caroline Gondim de. **PRODUÇÃO E PROCESSO DE DOWNSTREAM DE LIPOPEPTÍDEOS FUNGICIDAS PRODUZIDOS PELO *Bacillus subtilis* CNPMS 22**. 2019. 105 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

STABB, E V; JACOBSON, L M; HANDELSMAN, J. Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 60, n. 12, p. 4404-4412, dez. 1994. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.60.12.4404-4412.1994>.

STEIN, Torsten. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 56, n. 4, p. 845-857, 9 mar. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>.

THASANA, Nopporn; PRAPAGDEE, Benjaphorn; RANGKADILOK, Nuchanart; SALLABHAN, Ratiboot; AYE, Seaim Lwin; RUCHIRAWAT, Somsak; LOPRASERT, Suvit. *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtilene A, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated  $\beta$ -amino acid. **Febs Letters**, [s.l.], v. 584, n. 14, p. 3209-3214, 10 jun. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.005>.

THOMAS, Jacklyn; KIM, Ha Ram; RAHMATALLAH, Yasir; WIGGINS, Grant; YANG, Qinqing; SINGH, Raj; GLAZKO, Galina; MUKHERJEE, Arijit. RNA-seq reveals differentially expressed genes in rice (*Oryza sativa*) roots during interactions with plant-growth promoting bacteria, *Azospirillum brasilense*. **Plos One**, [s.l.], v. 14, n. 5, p. 0217309, 23 maio 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0217309>.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H.. Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 37, n. 5, p. 1016-1024, maio 1979. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.37.5.1016-1024.1979>.

TIKHONOVA, Ekaterina N.; GROUZDEV, Denis S.; KRAVCHENKO, Irina K.. *Azospirillum palustre* sp. nov., a methylotrophic nitrogen-fixing species isolated from raised

bog. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 69, n. 9, p. 2787-2793, 1 set. 2019. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003560>.

TYC, Olaf; SONG, Chunxu; DICKSCHAT, Jeroen S.; VOS, Michiel; GARBEVA, Paolina. The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 25, n. 4, p. 280-292, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.002>.

UMEZAWA, Hamao; AOYAGI, Takaaki; NISHIKIORI, Takaaki; OKUYAMA, Akira; YAMAGISHI, Yuji; HAMADA, Masa; TAKEUCHI, Tomio. Plipastatins: new inhibitors of phospholipase a2, produced by bacillus cereus bmg302-ff67. i. taxonomy, production, isolation and preliminary characterization.. **The Journal Of Antibiotics**, [s.l.], v. 39, n. 6, p. 737-744, 1986. Japan Antibiotics Research Association. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.39.737>.

VANITTANAKOM, Nongnuch; LOEFFLER, Wolfgang; KOCH, Ulrike; JUNG, Günther. Fengycin - A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by Bacillus subtilis F-29-3. **The Journal Of Antibiotics**, [s.l.], v. 39, n. 7, p. 888-901, 1986. Japan Antibiotics Research Association. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.39.888>.

WALTON, Robert B. et al. A crystalline antifungal agent, mycosubtilin, isolated from subtilin broth. **The Journal of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 28, n. 5, p. 924-926, 1949.

WANG, Tao *et al.* Natural products from Bacillus subtilis with antimicrobial properties. **Chinese Journal Of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 744-754, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjche.2014.05.020>.

WANG, Yu *et al.* Separation and extraction of antimicrobial lipopeptides produced by Bacillus amyloliquefaciens ES-2 with macroporous resin. **European Food Research And Technology**, [s.l.], v. 231, n. 2, p. 189-196, 8 abr. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-010-1271-1>.

WILSON, Ian D. *et al.* High Resolution “Ultra Performance” Liquid Chromatography Coupled to oa-TOF Mass Spectrometry as a Tool for Differential Metabolic Pathway Profiling in Functional Genomic Studies. **Journal Of Proteome Research**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 591-598, 19 mar. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/pr049769r>.

WINKELMANN, G.; ALLGAIER, H.; LUPP, R.; JUNG, G.. Iturin AL - A new long chain iturin a possessing an unusual high content of C16-.BETA.-amino acids. **The Journal Of Antibiotics**, [s.l.], v. 36, n. 11, p. 1451-1457, 1983. Japan Antibiotics Research Association. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.36.1451>.

YÁNEZ-MENDIZÁBAL, Viviana *et al.* Biological control of peach brown rot (Monilinia spp.) by Bacillus subtilis CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. **European Journal Of Plant Pathology**, [s.l.], v. 132, n. 4, p. 609-619, 27 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-011-9905-0>.

YANG, Huan *et al.* Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 407, n. 9, p. 2529-2542, 10 fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-015-8486-8>.

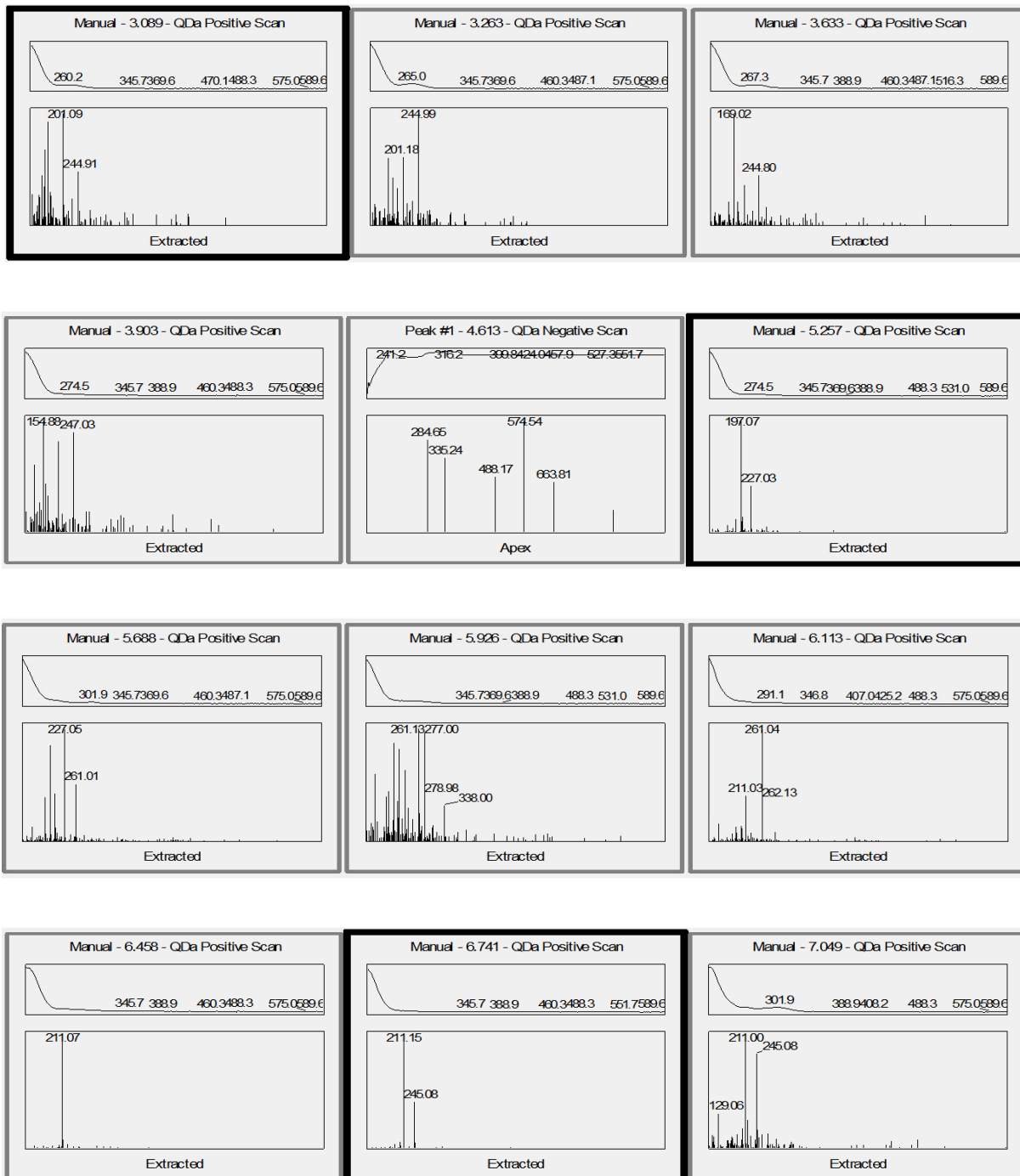
ZHANG, Dongliang *et al.* An efficient method for separation of surfactin from *Bacillus amyloliquefaciens* fmb50 broth by flocculation. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 49, n. 7, p. 1182-1188, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.021>.

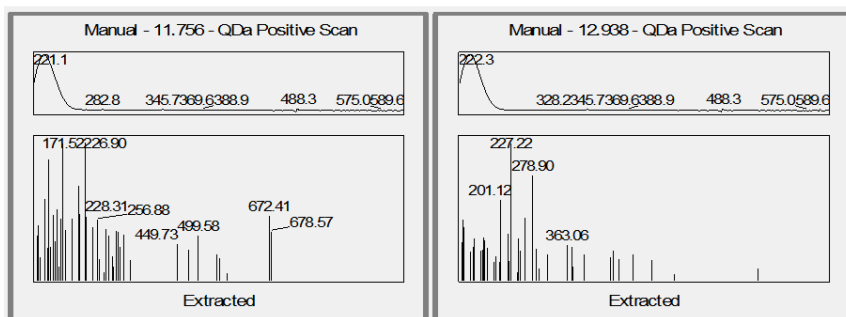
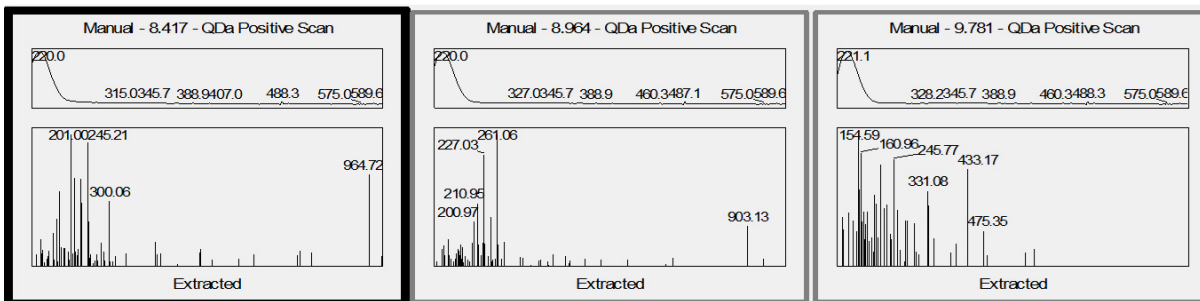
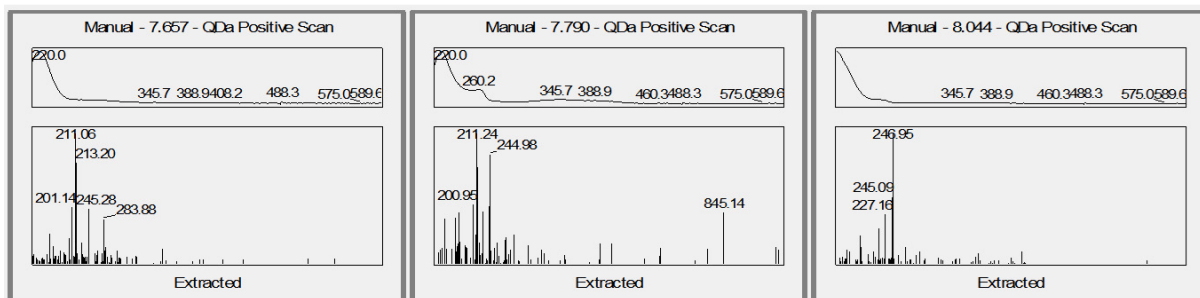
ZHANG, Lingling; YU, Jie; XIE, Yufei; LIN, Hongli; HUANG, Zhipeng; XU, Lei; GELBIČ, Ivan; GUAN, Xiong. Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: bacillaceae) chitinase against *Caenorhabditis elegans* (Rhabditida). **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 107, n. 2, p. 551-558, 1 abr. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1603/ec13201>.

ZHAO, Ying-Yong; LIN, Rui-Chao. UPLC–MSE application in disease biomarker discovery: the discoveries in proteomics to metabolomics. **Chemico-Biological Interactions**, [s.l.], v. 215, p. 7-16, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.02.014>.

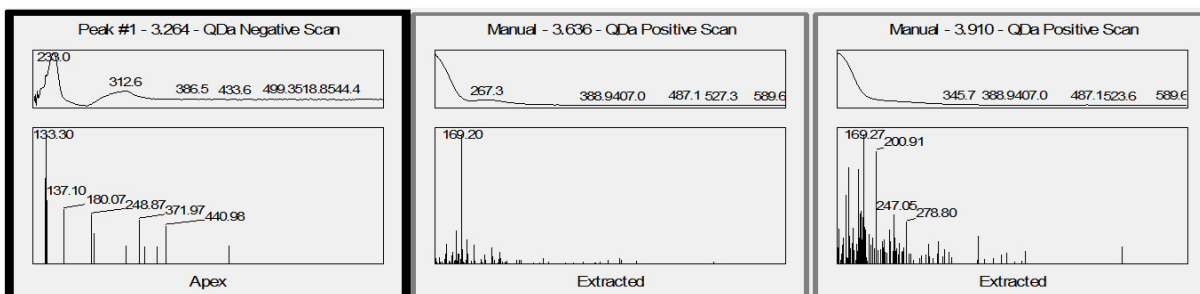
ZHAO, Ying-Yong *et al.* Ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry as a sensitive and powerful technology in lipidomic applications. **Chemico-Biological Interactions**, [s.l.], v. 220, p. 181-192, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.06.029>.

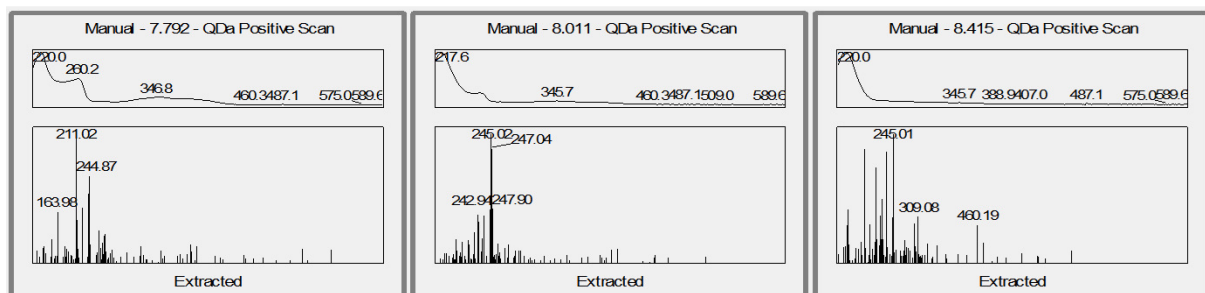
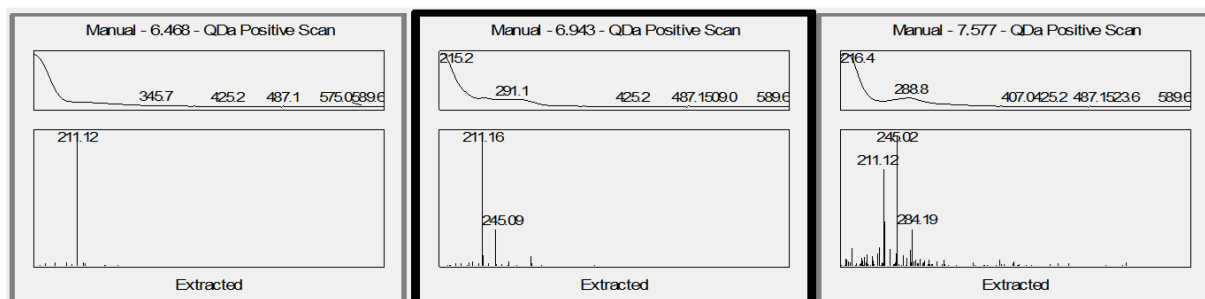
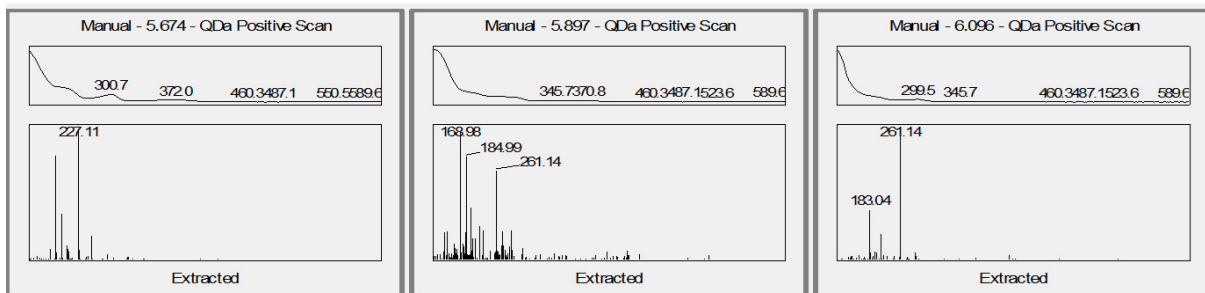
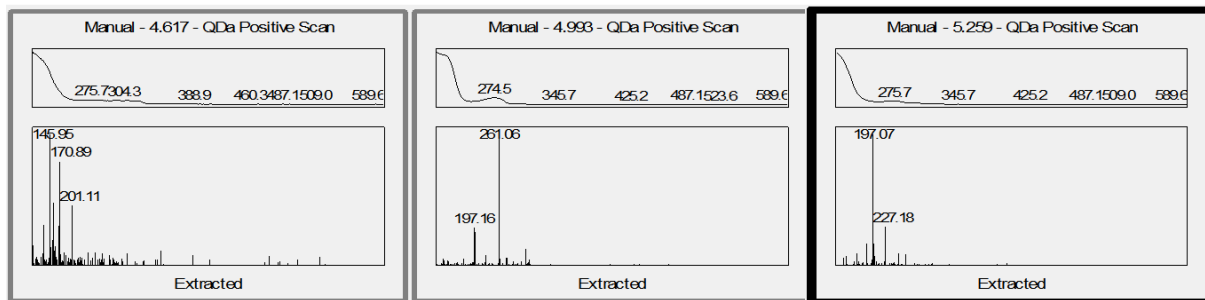
## ANEXO A – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 502



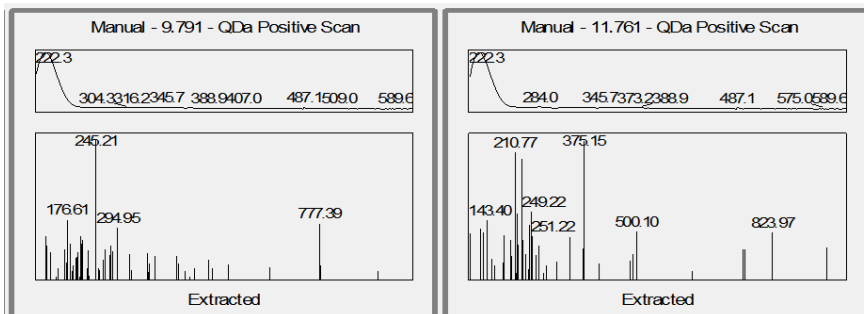
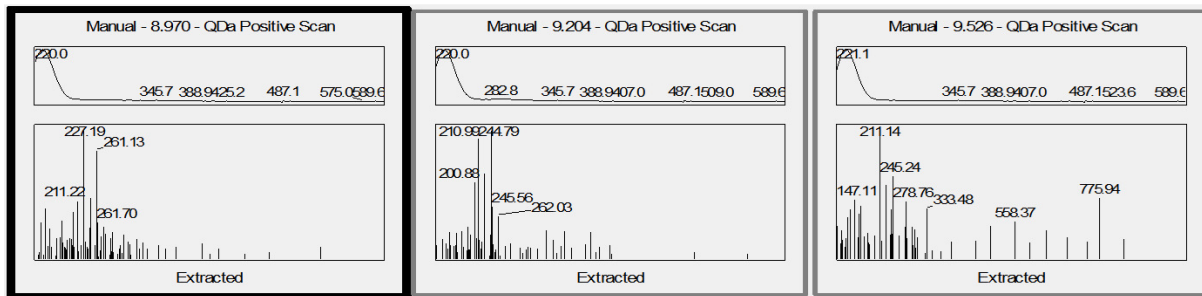


## ANEXO B – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 503

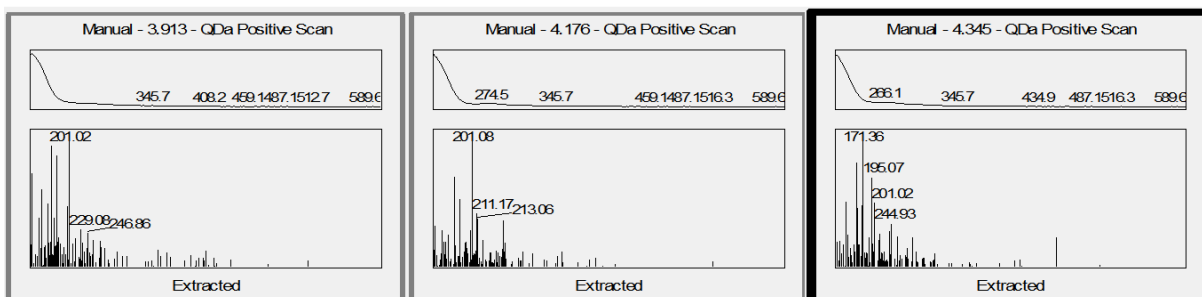
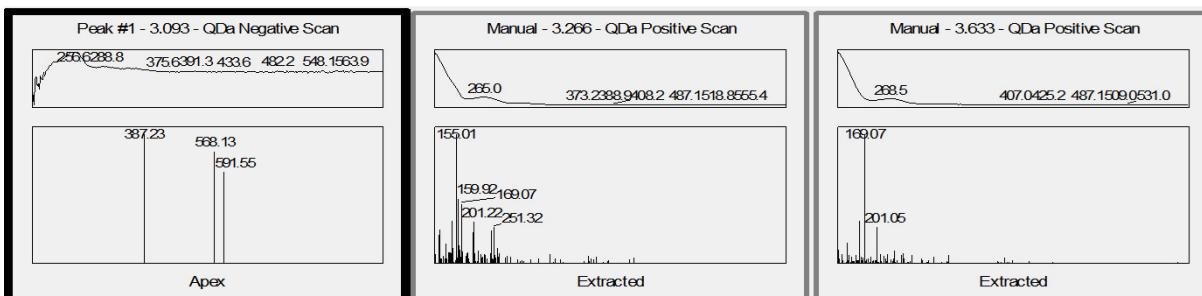


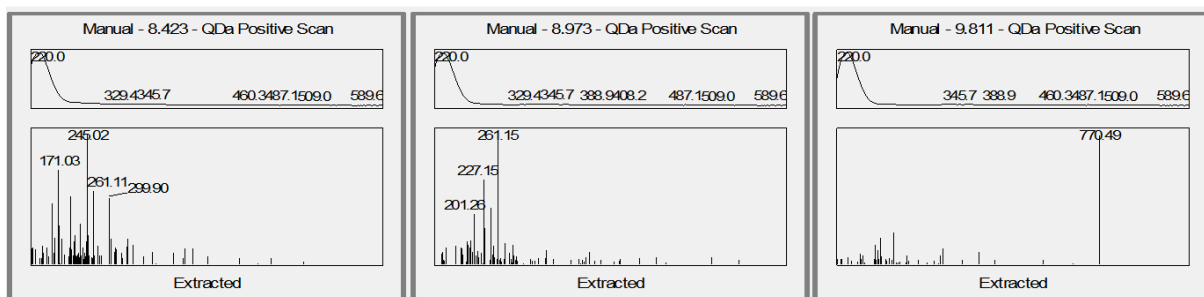
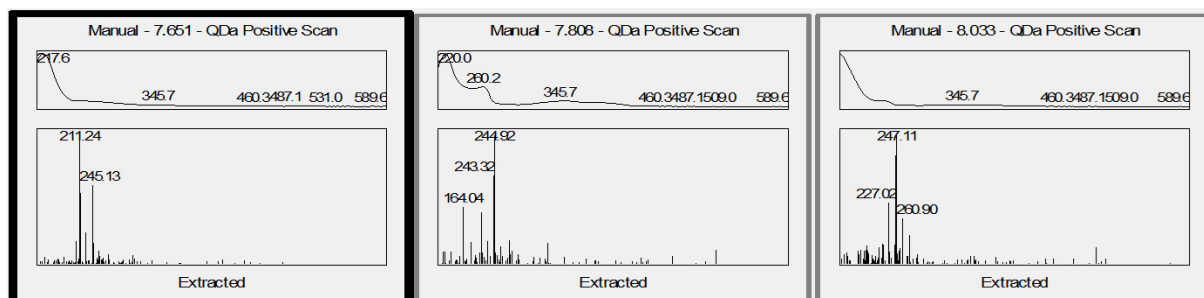
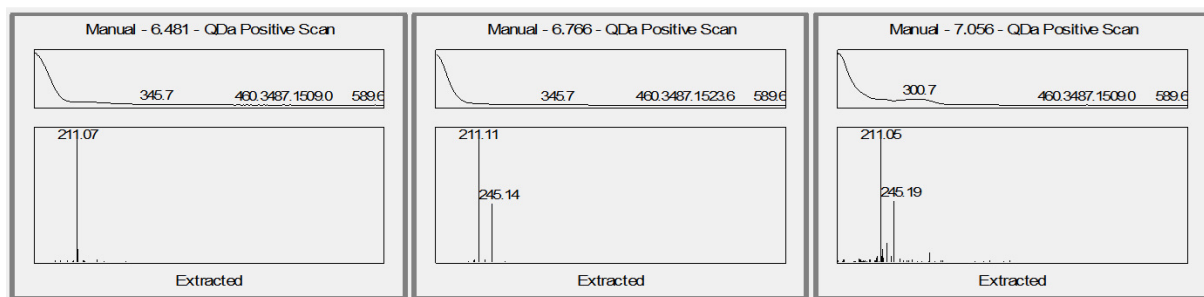
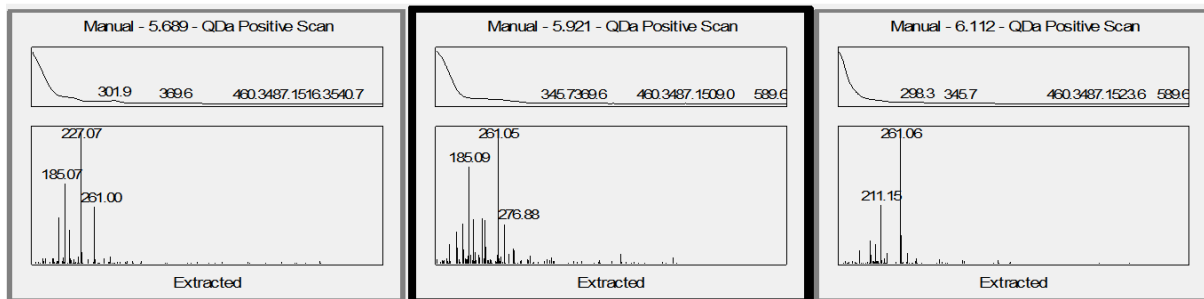
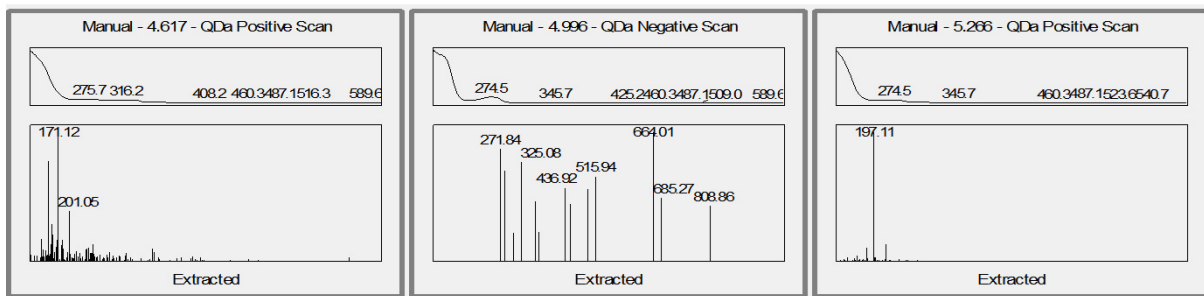


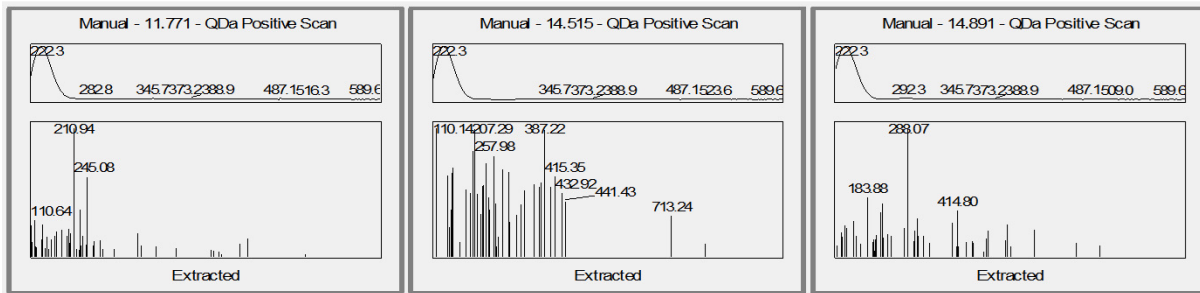




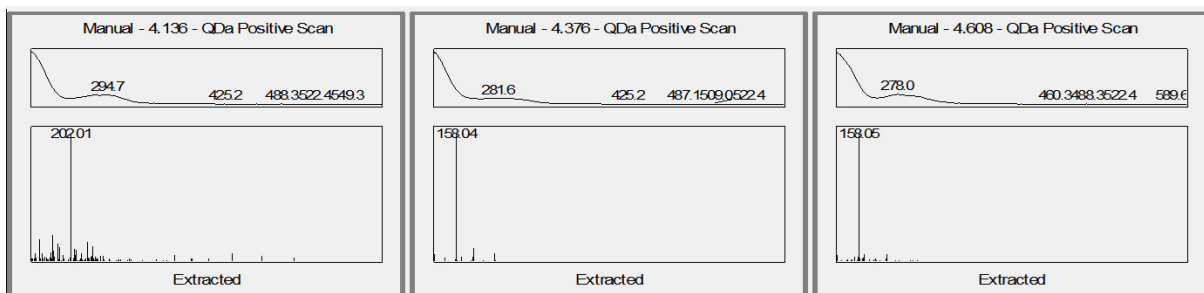
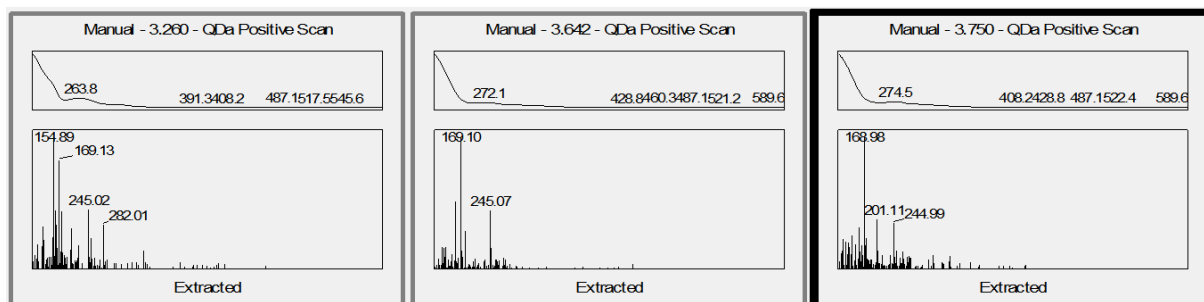
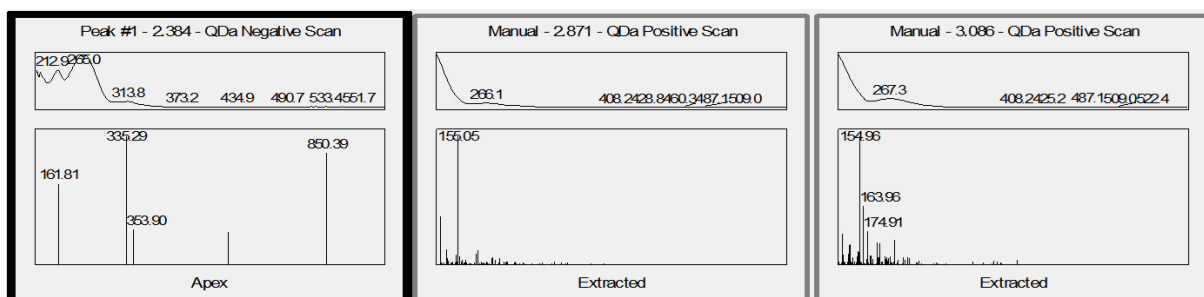
## ANEXO C – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 504

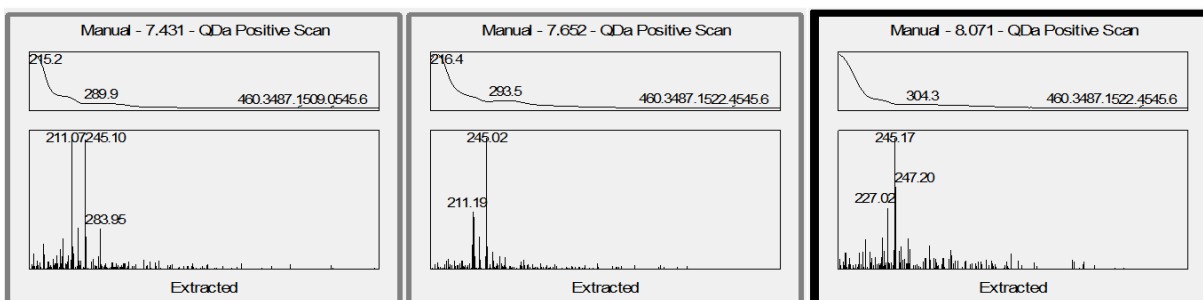
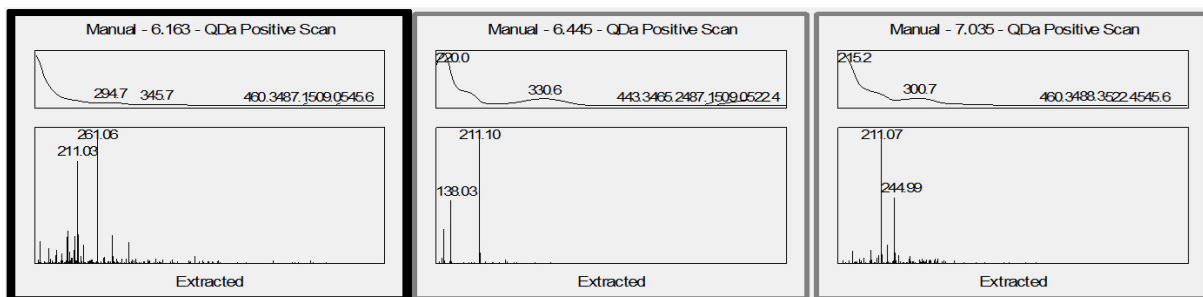
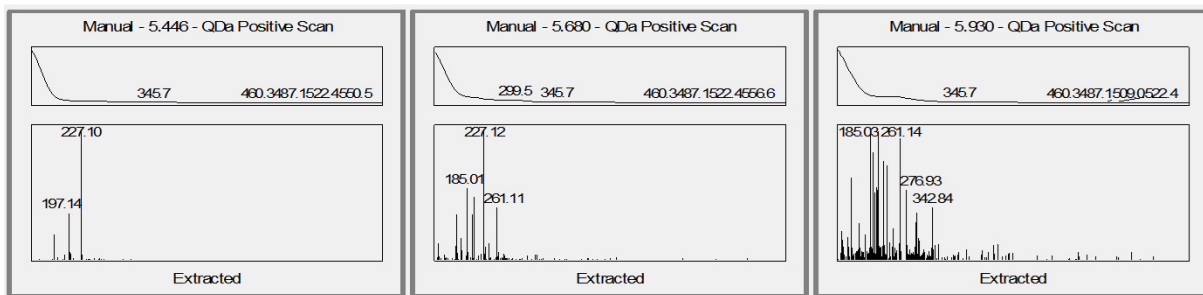
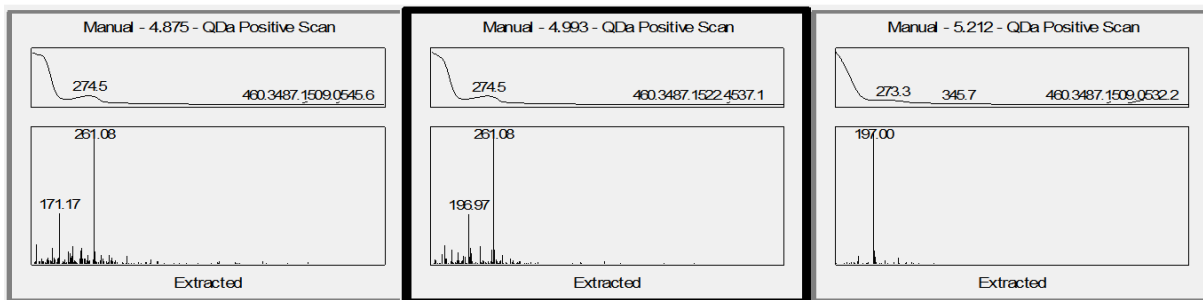


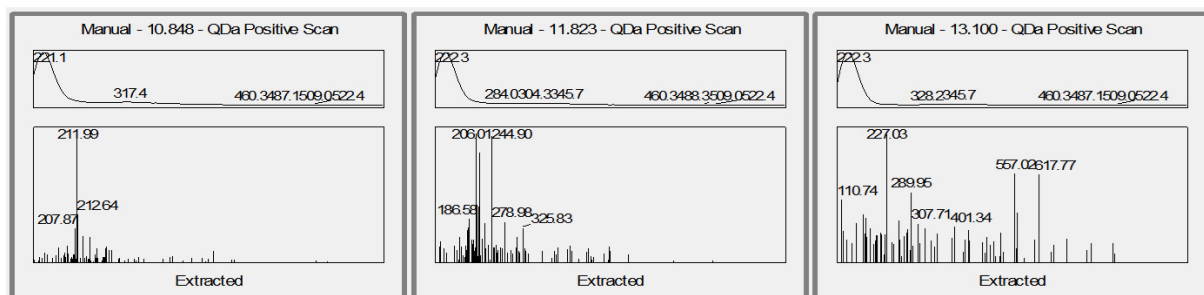
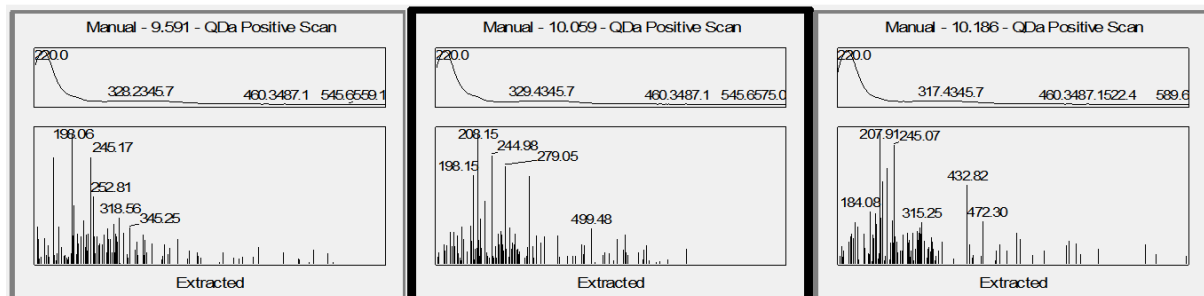
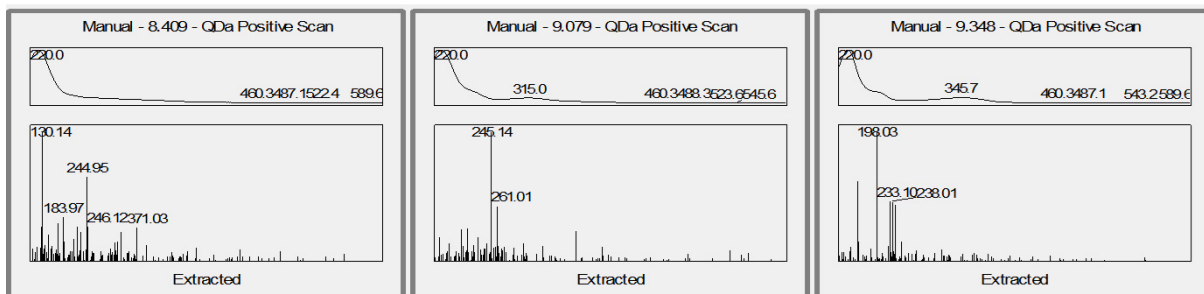




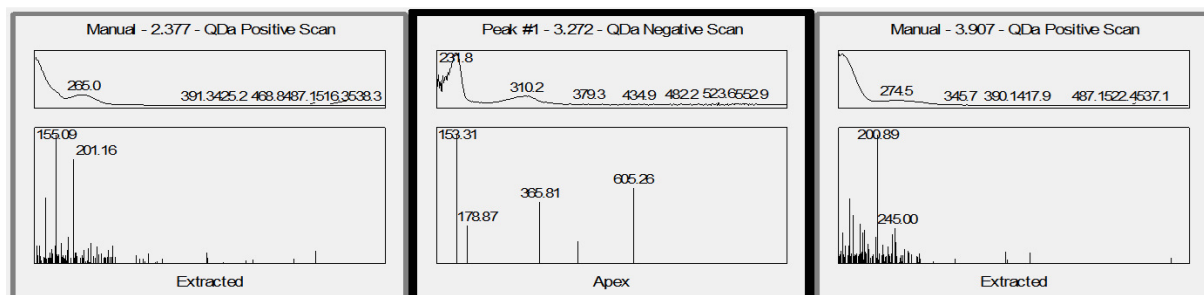
## ANEXO D – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 505

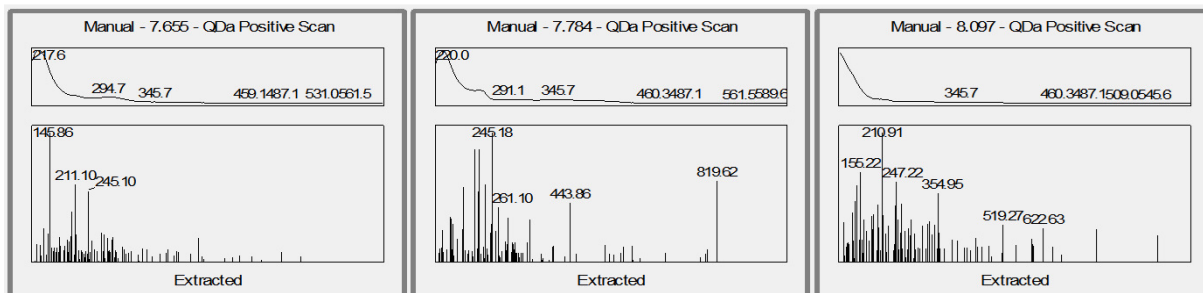
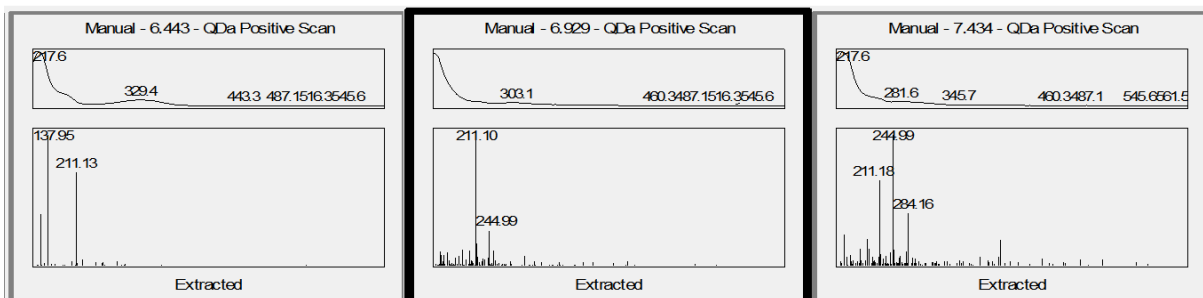
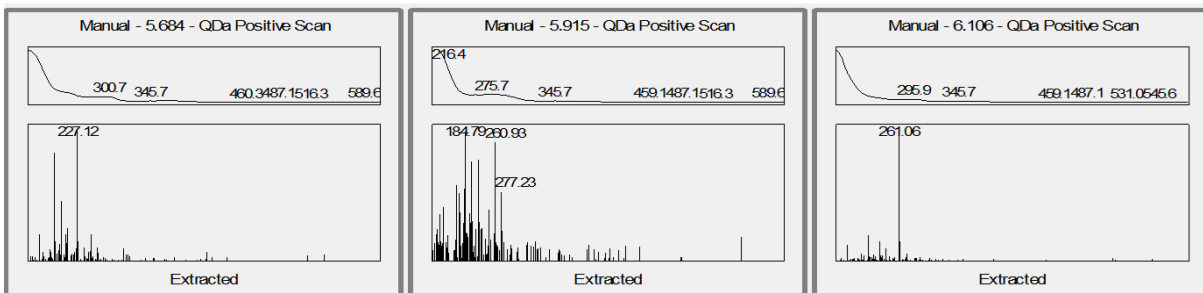
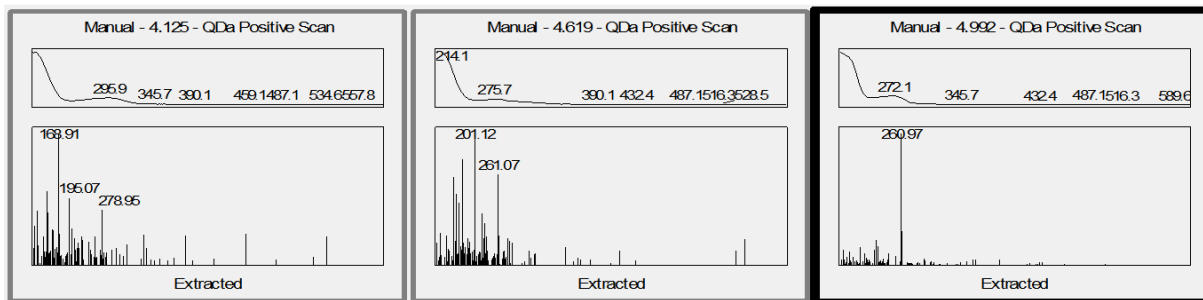


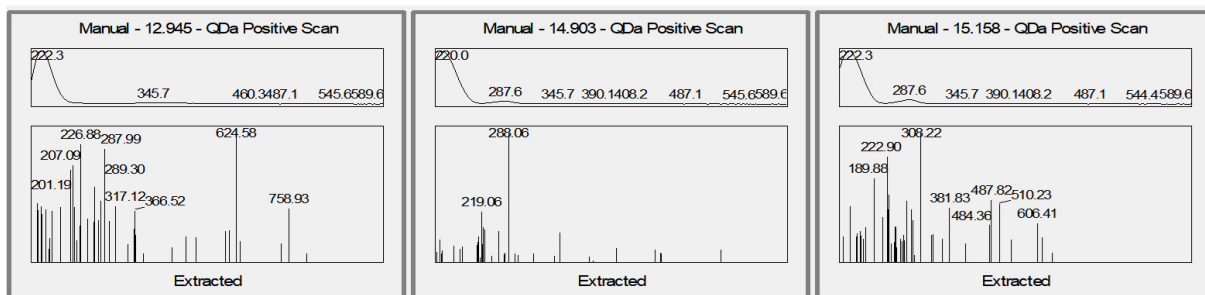
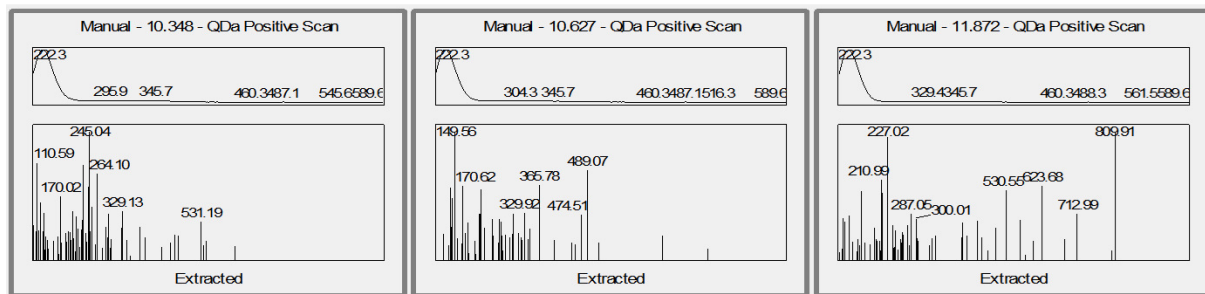
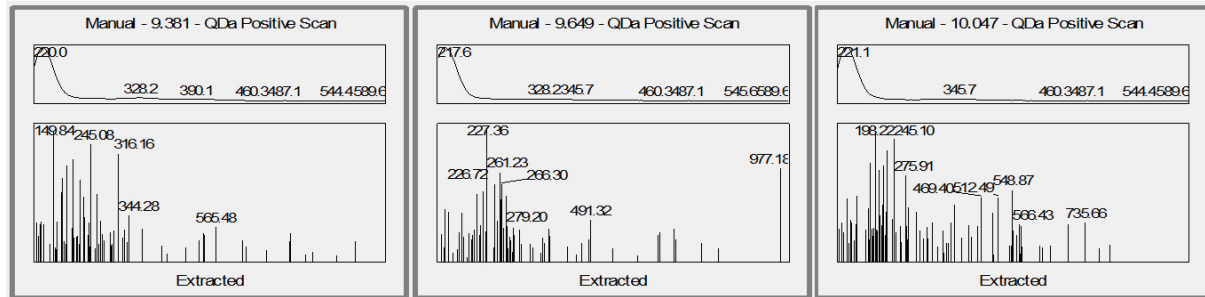
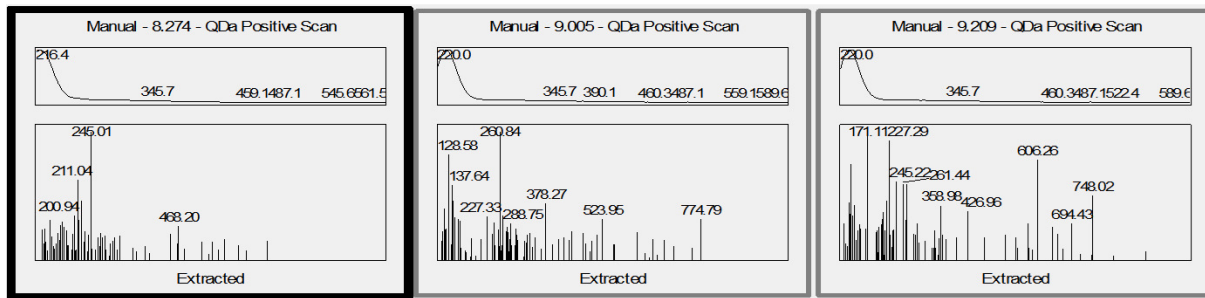




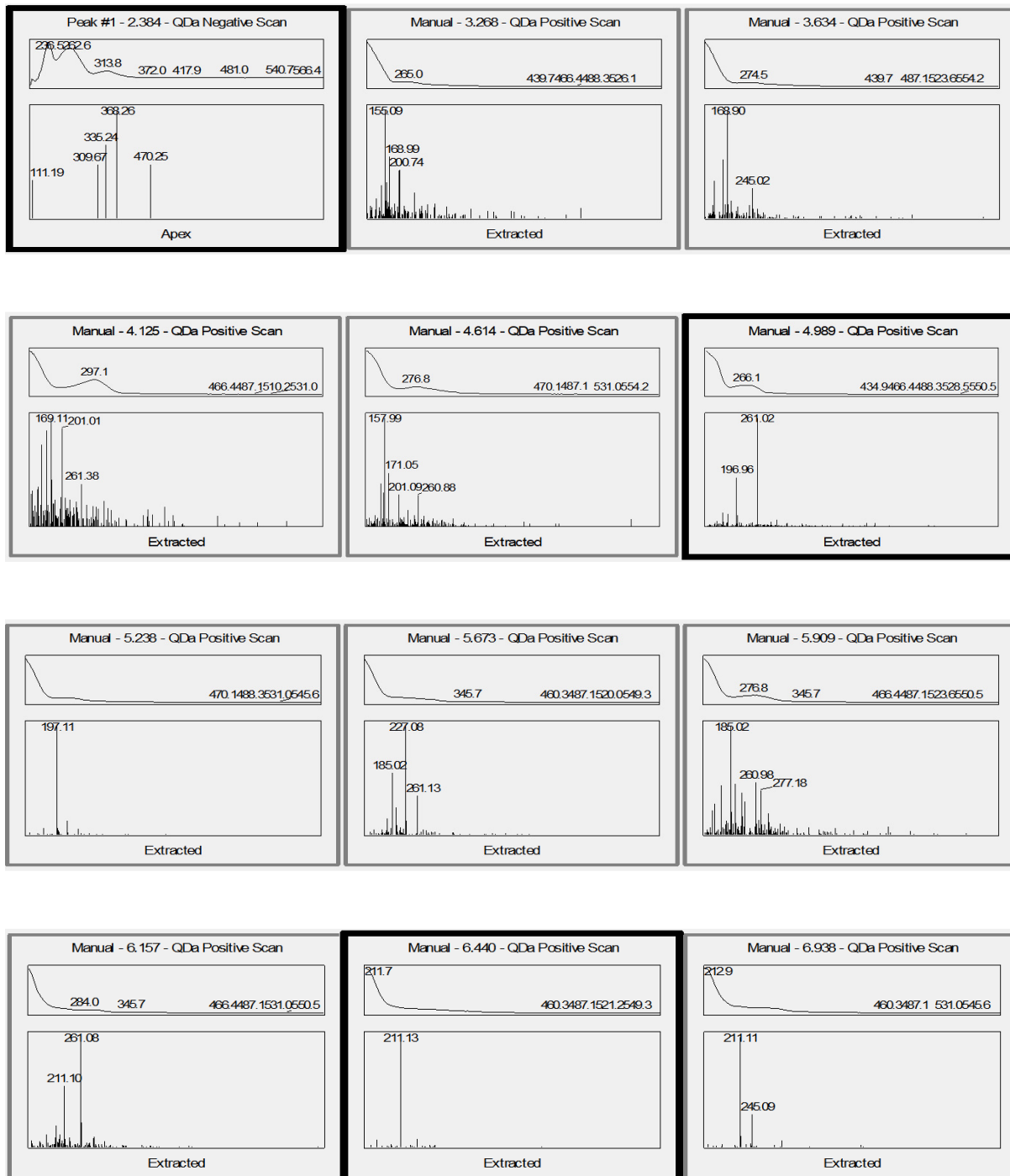
## ANEXO E – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 506



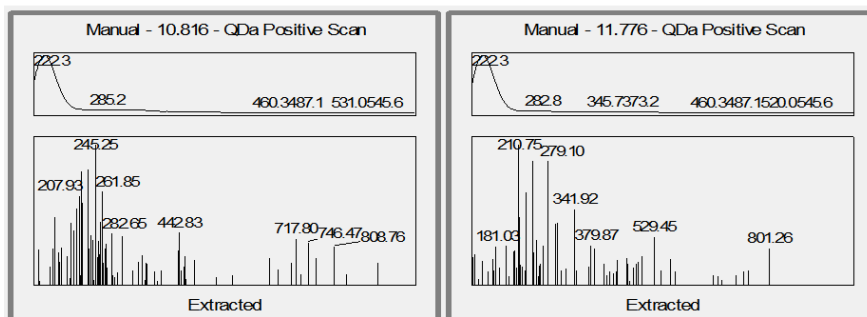
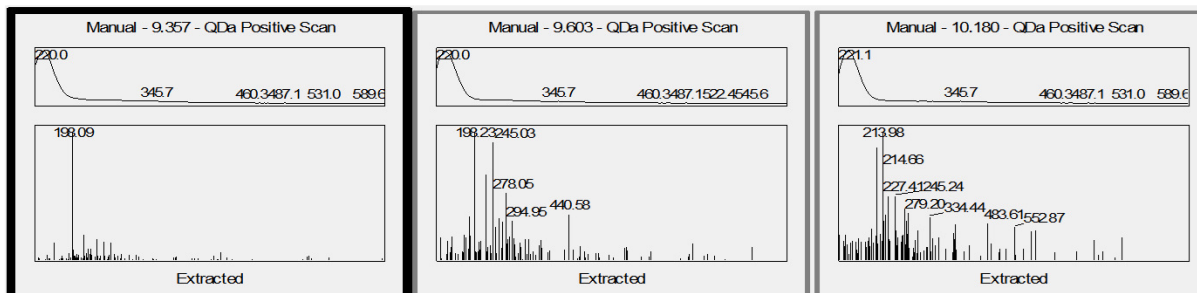
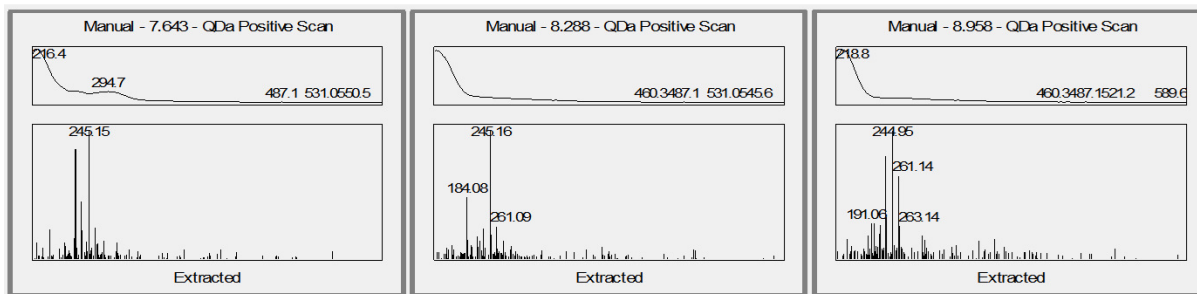




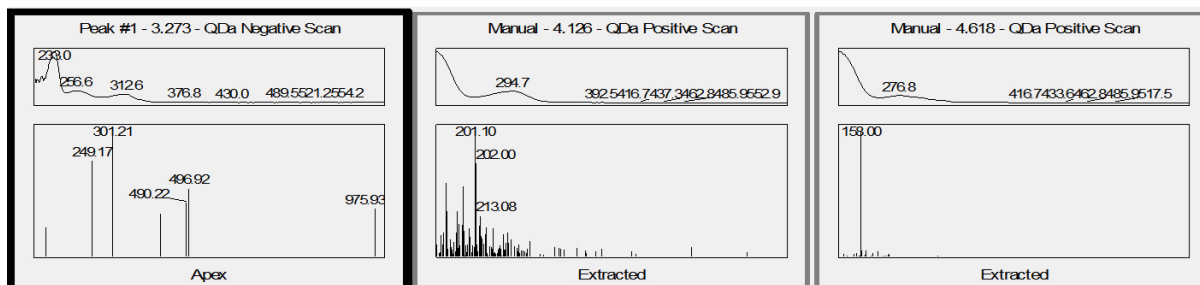
## ANEXO F – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 507

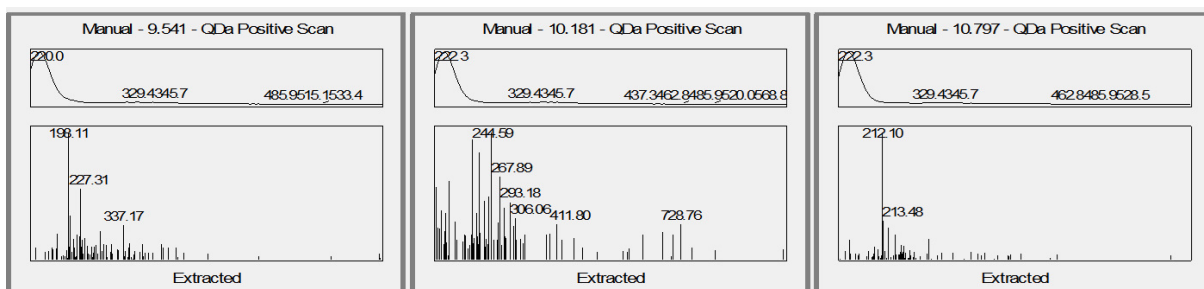
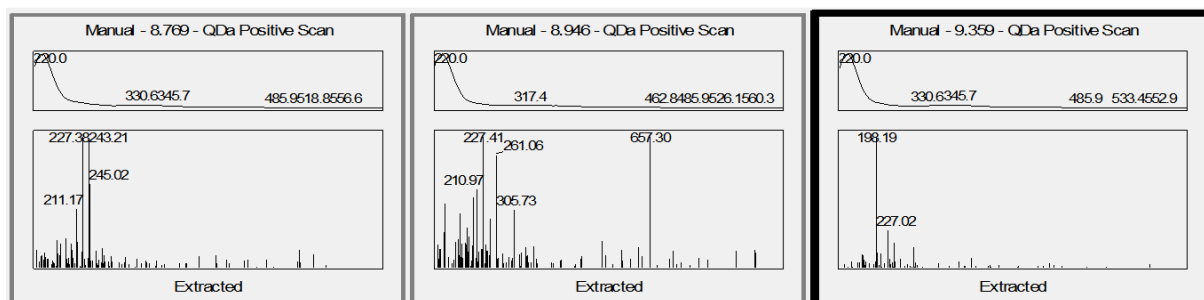
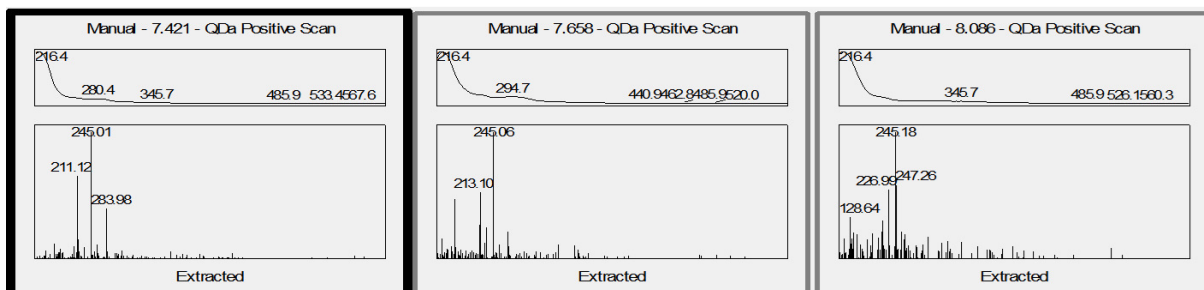
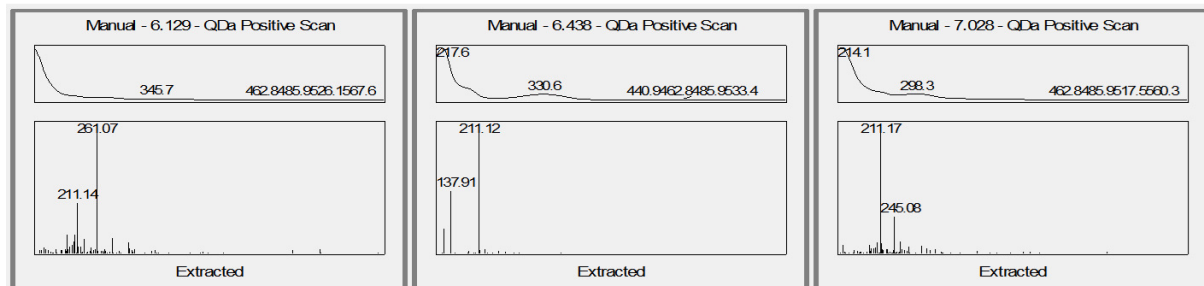
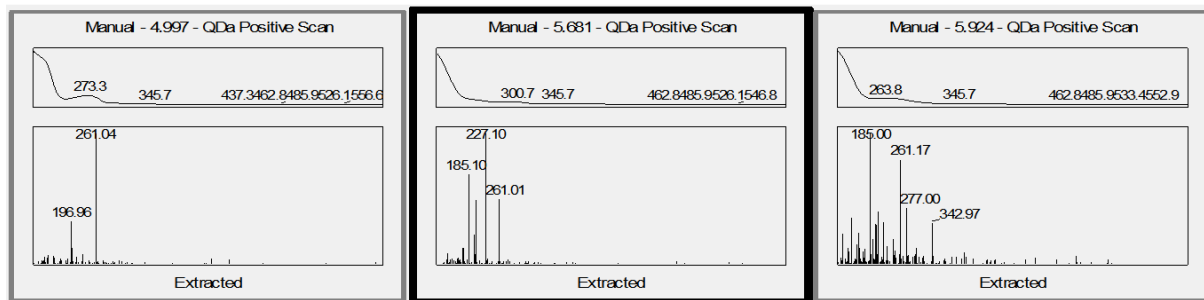


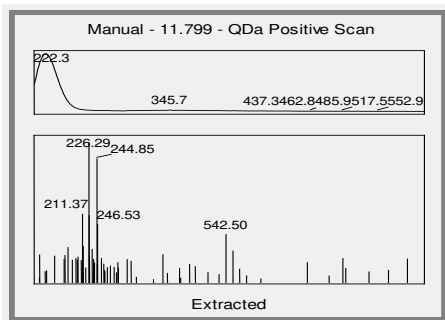




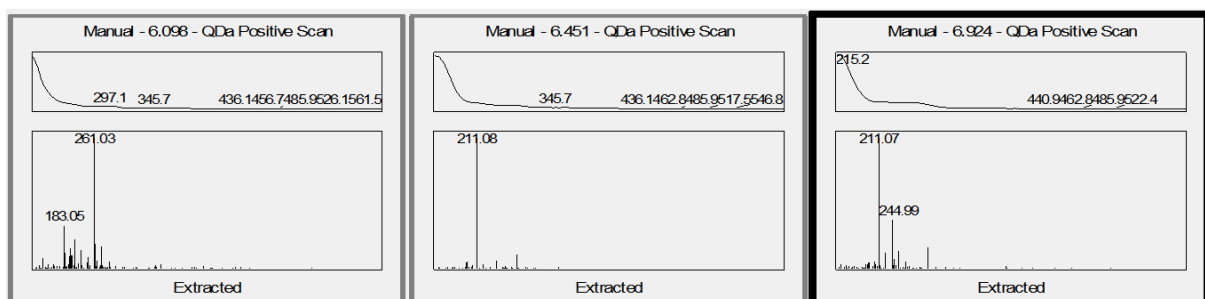
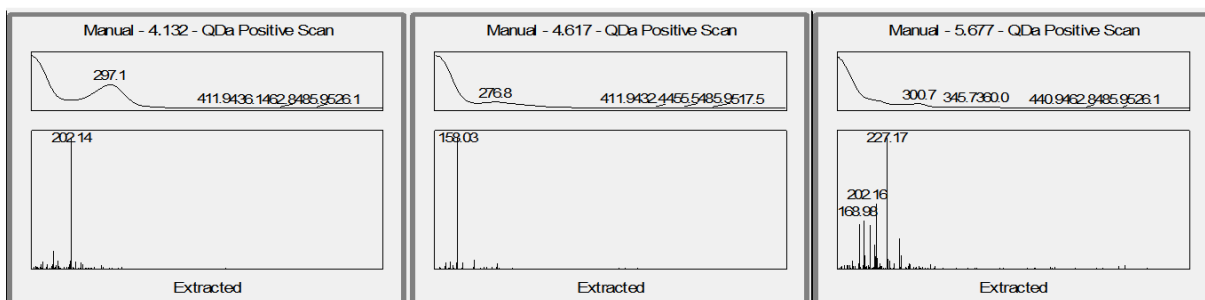
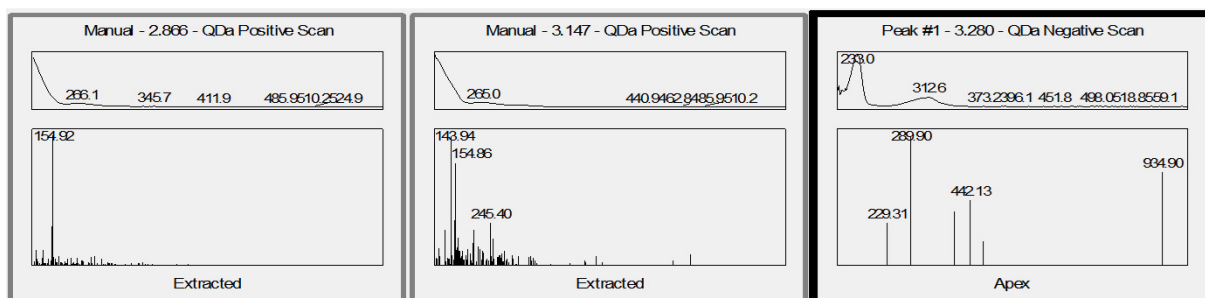
**ANEXO G – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 508**

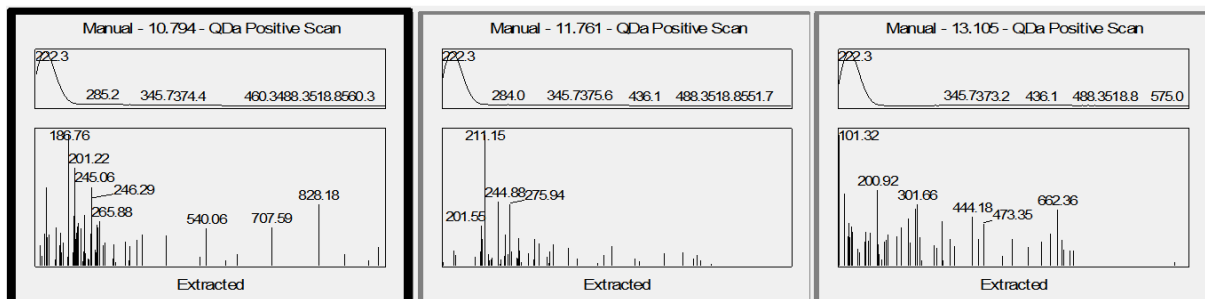
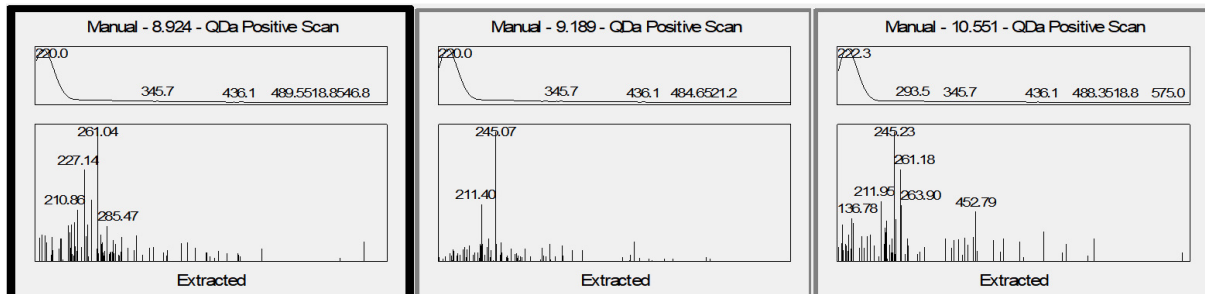
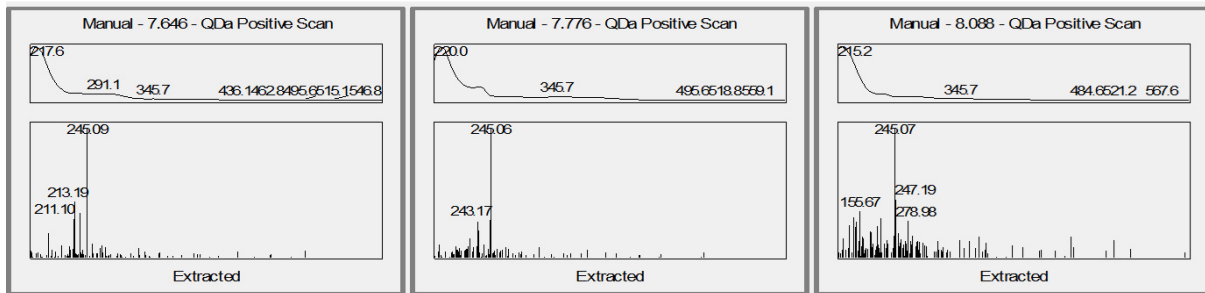




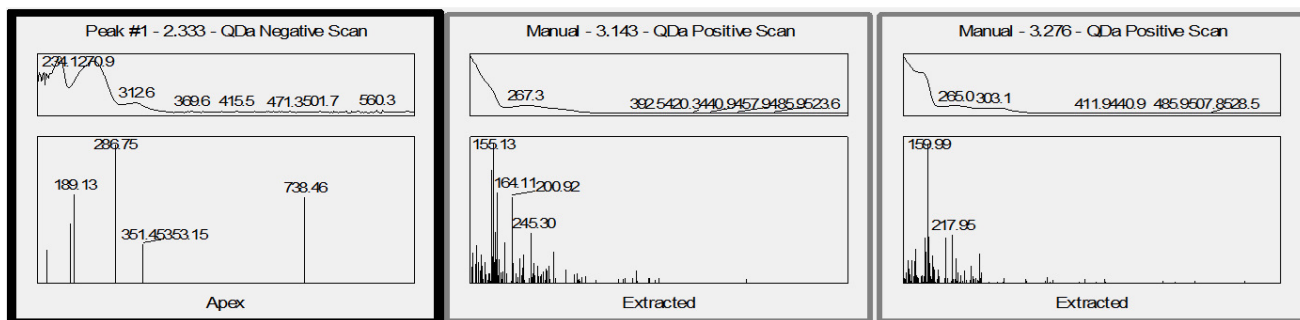


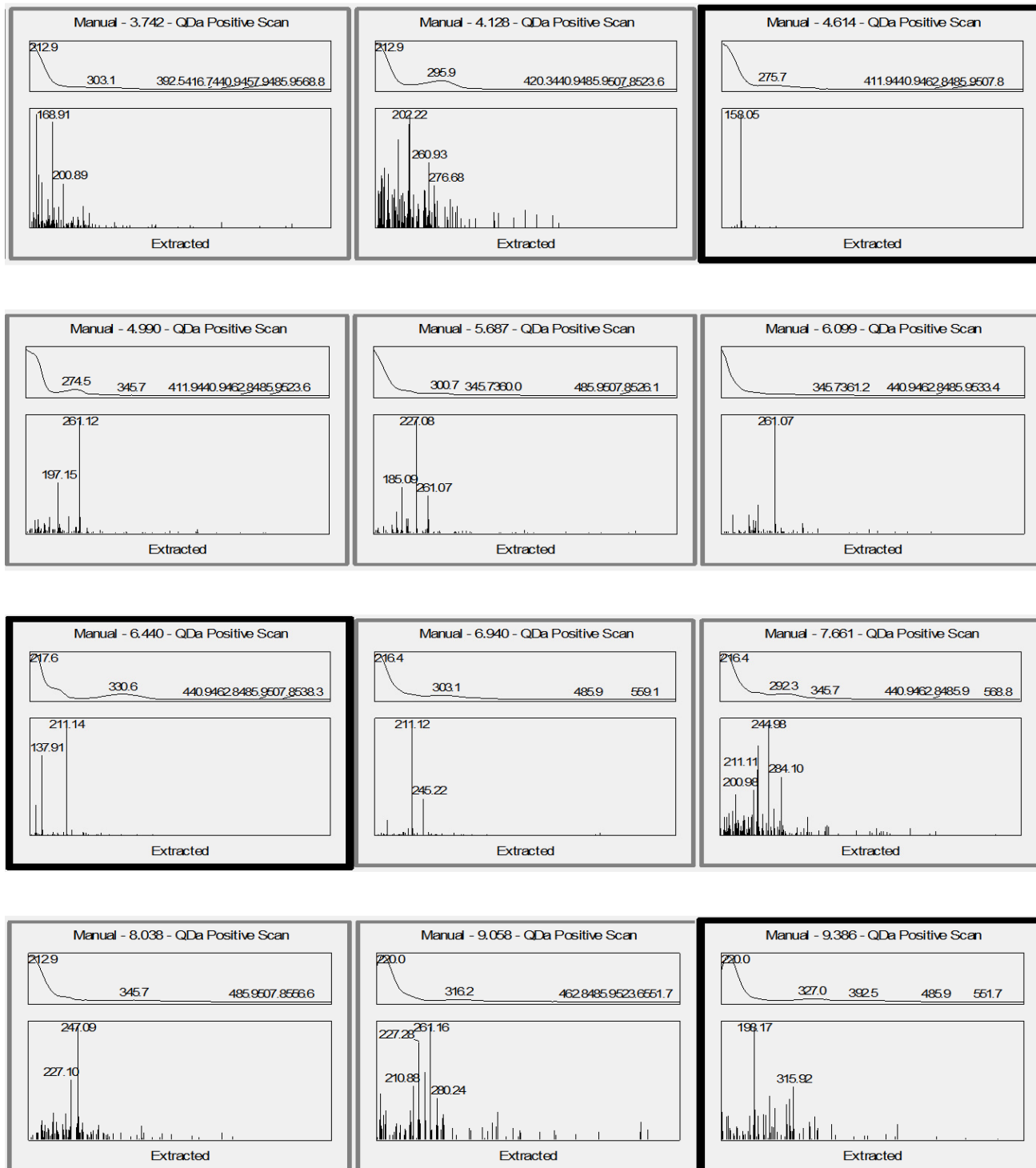
## ANEXO H – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 510

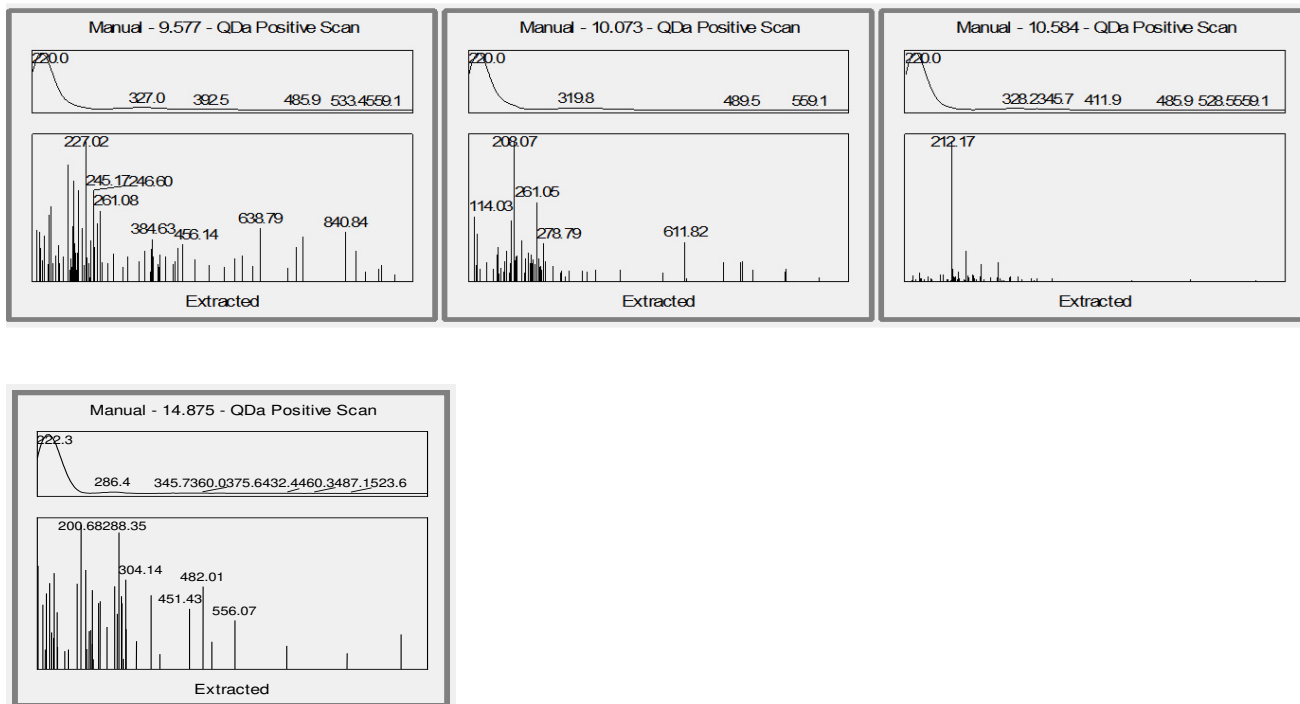




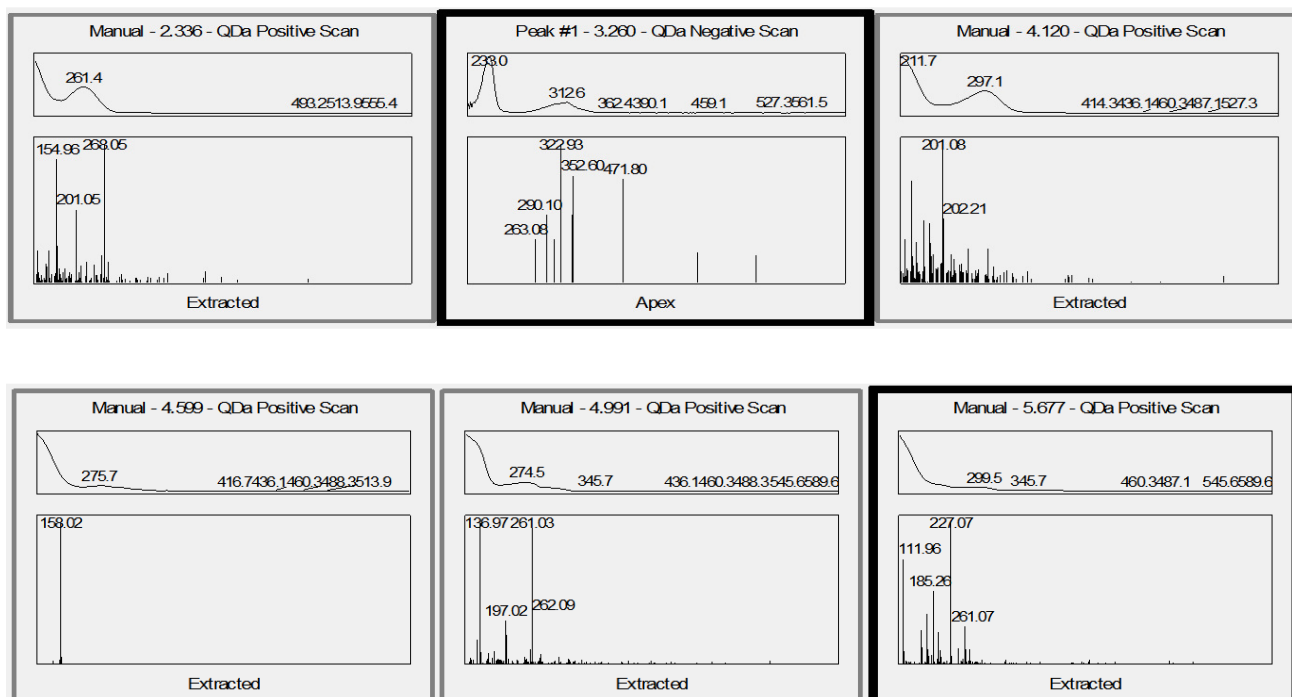
**ANEXO I – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 511**

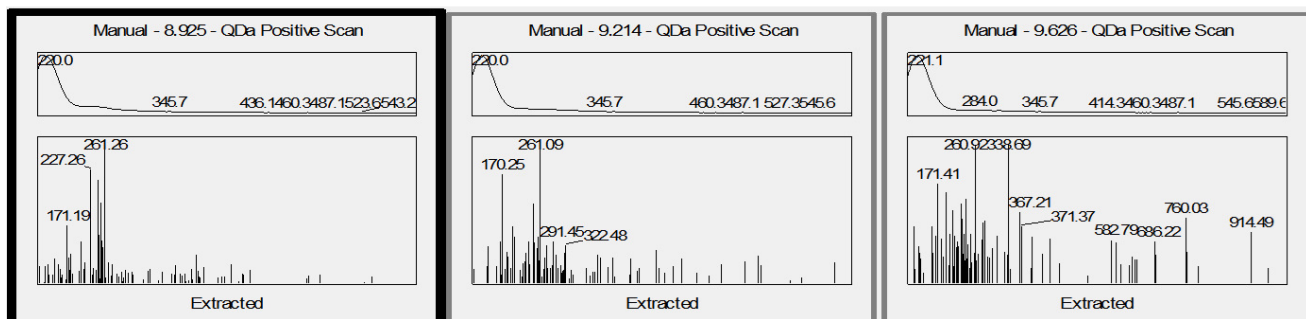
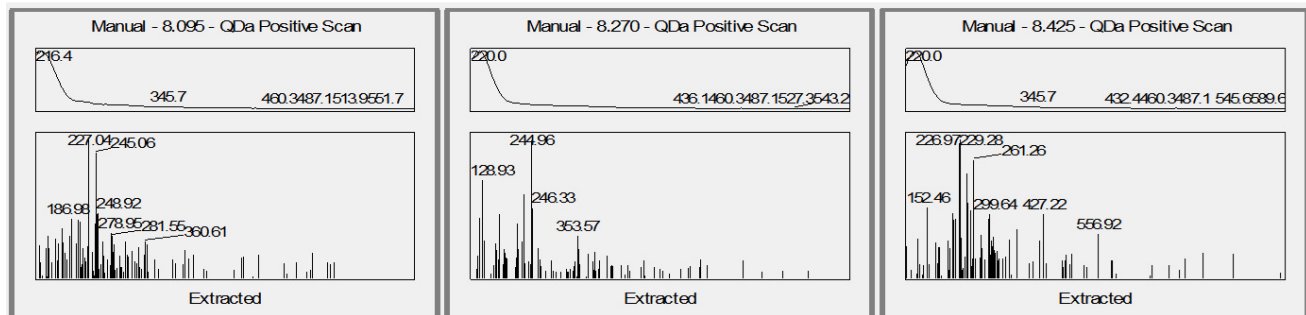
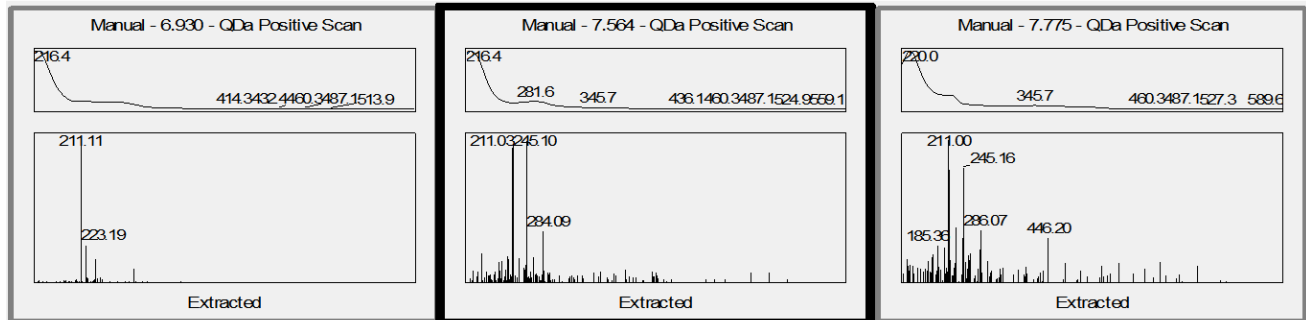
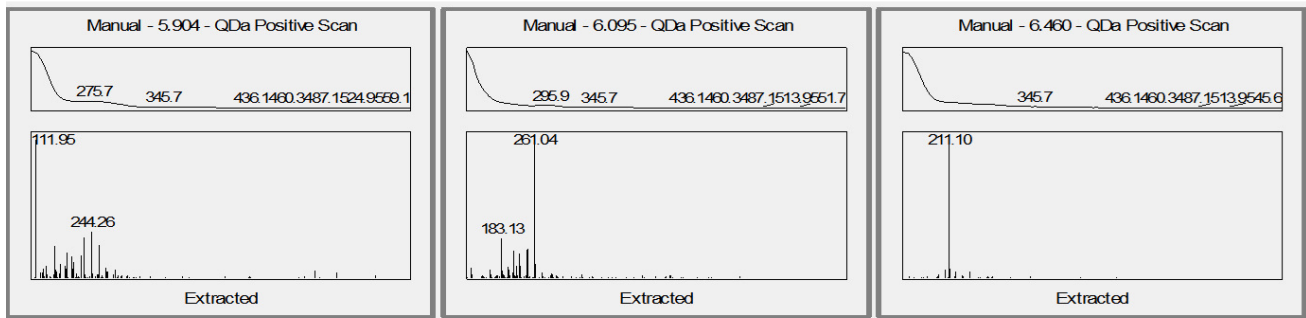


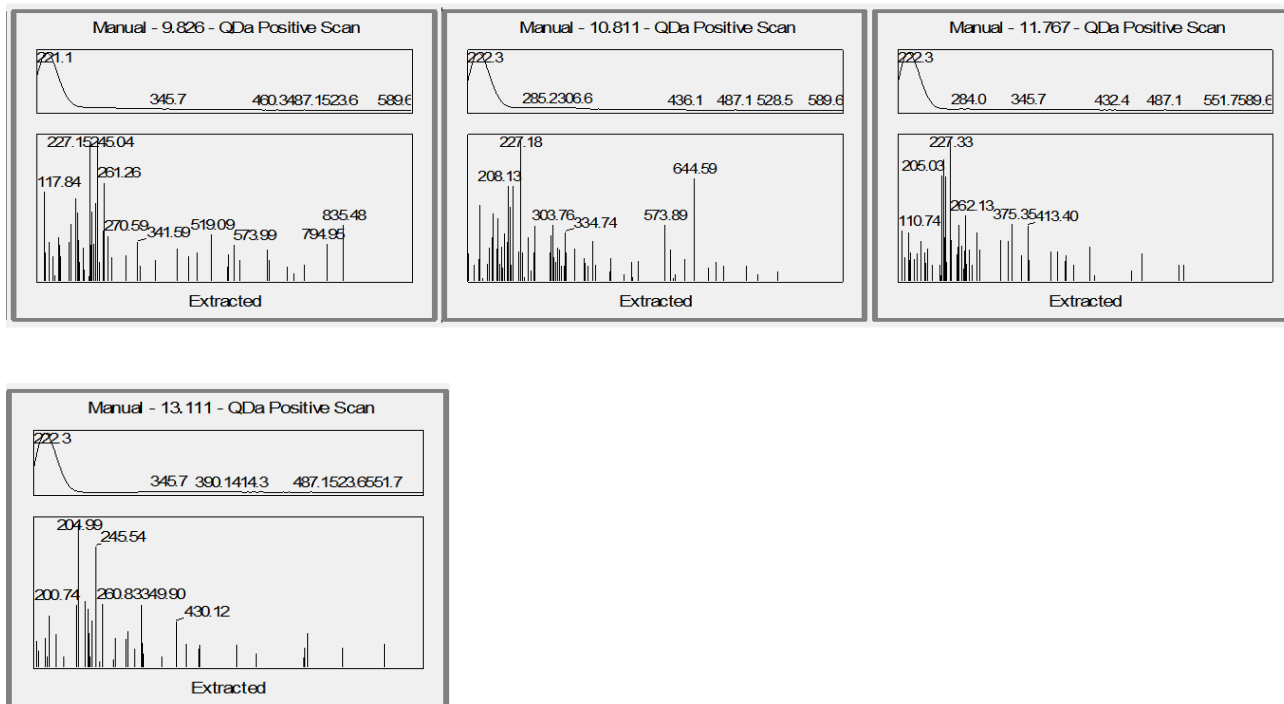




## ANEXO J – ESPECTRO DE MASSAS E UV-VIS DO EXTRATO ACETATO 512

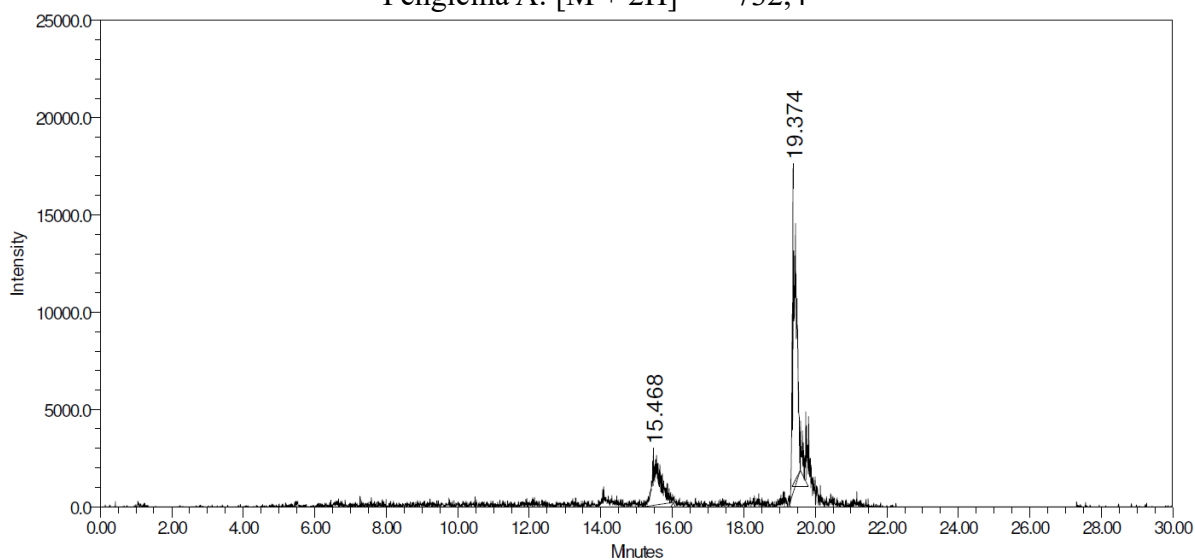






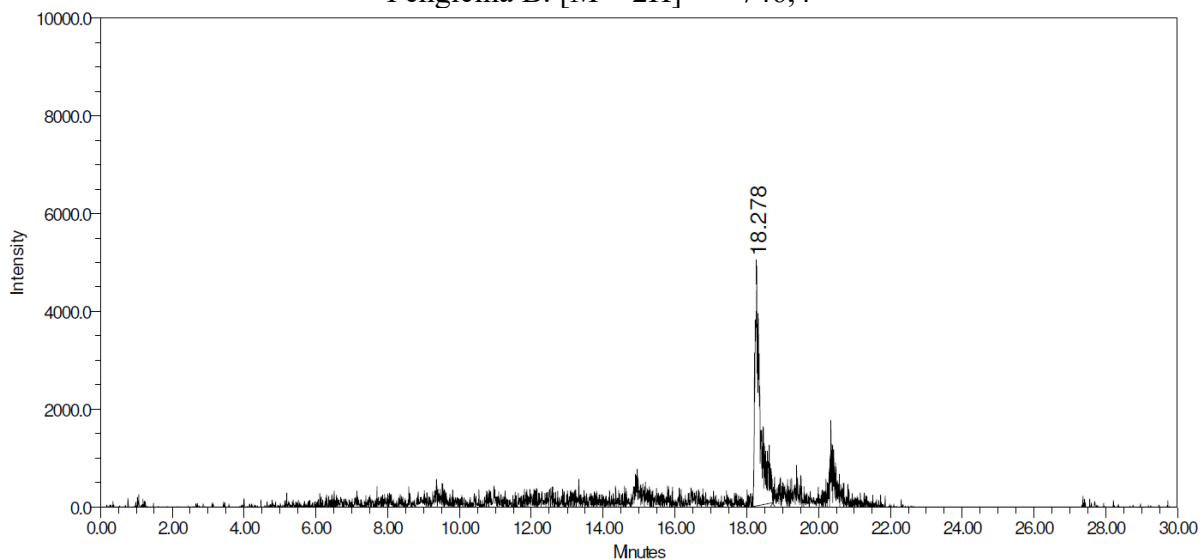
## ANEXO K – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO ACETATO NÃO-INOCULADO

Fengicina A:  $[M + 2H]^{2+} = 732,4$



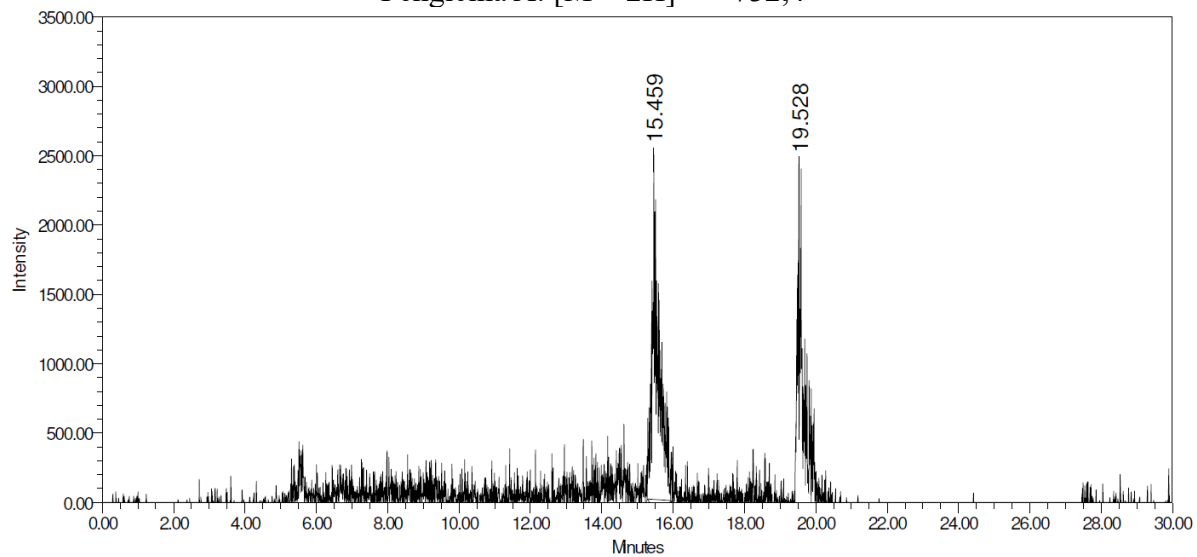


Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 746,4$



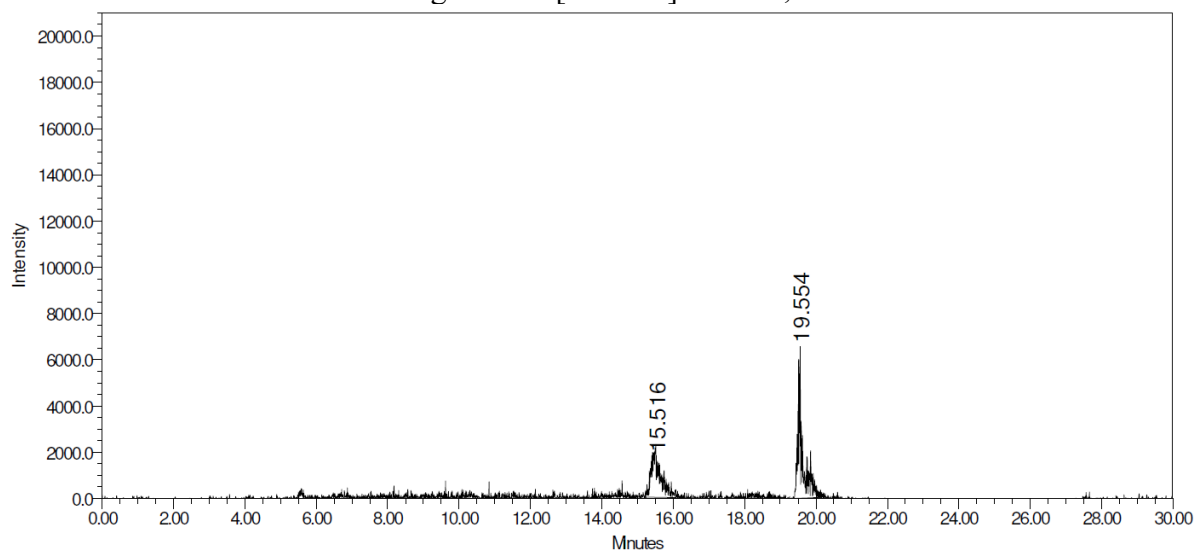
**ANEXO L – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO  
ACETATO 502**

Fengicina A:  $[M + 2H]^{2+} = 732,4$



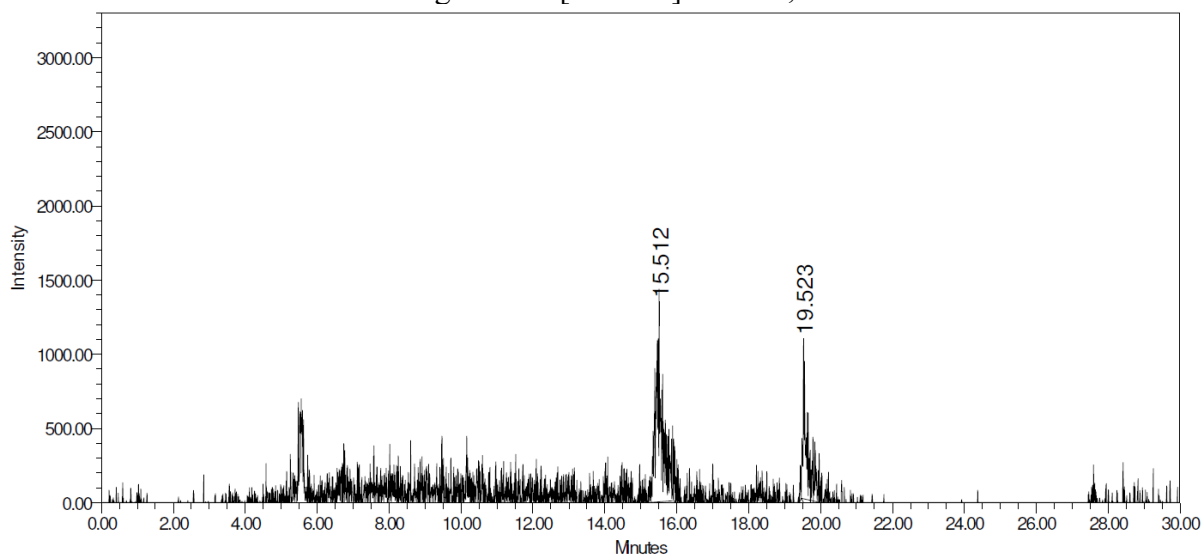
**ANEXO M – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO  
ACETATO 503**

Fengicina A:  $[M + 2H]^{2+} = 732,4$

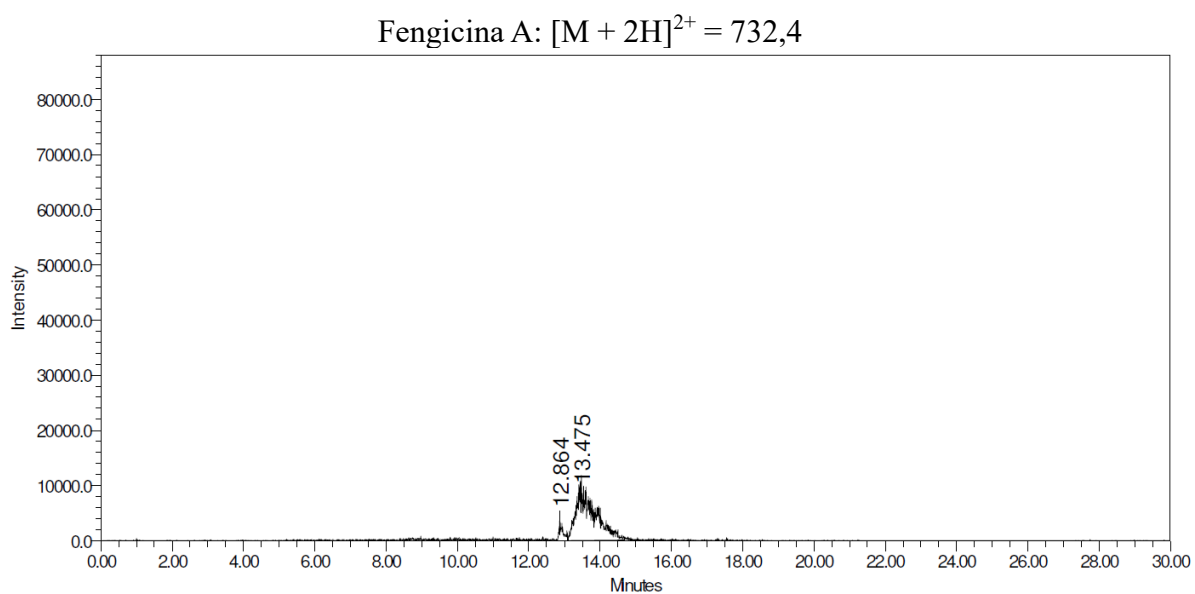
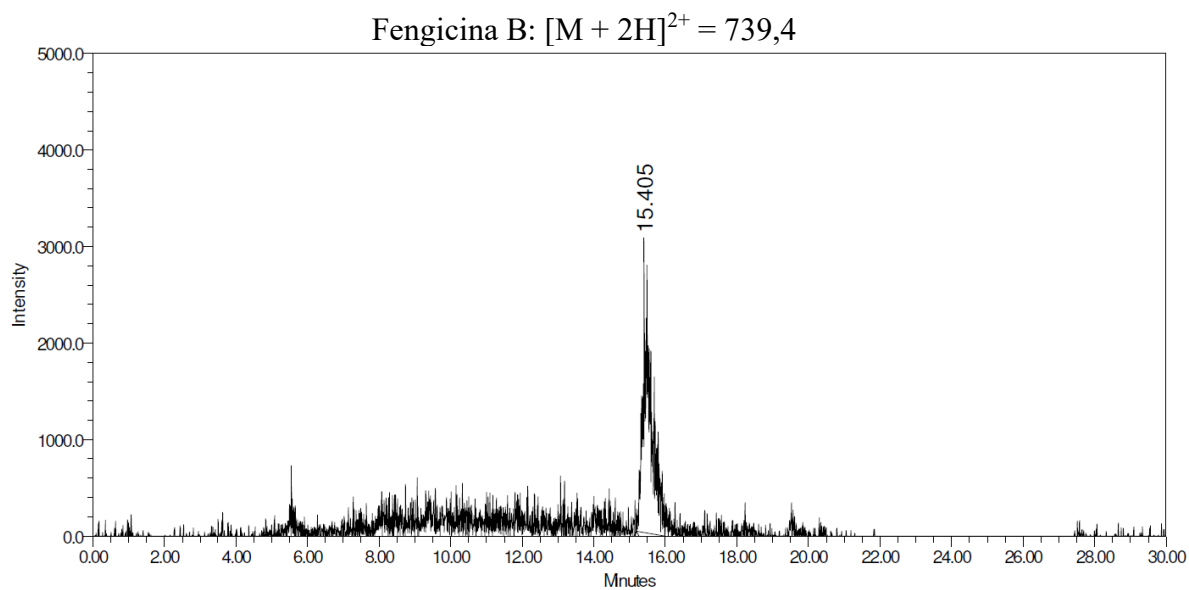


**ANEXO N – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO  
ACETATO 504**

Fengicina A:  $[M + 2H]^{2+} = 732,4$

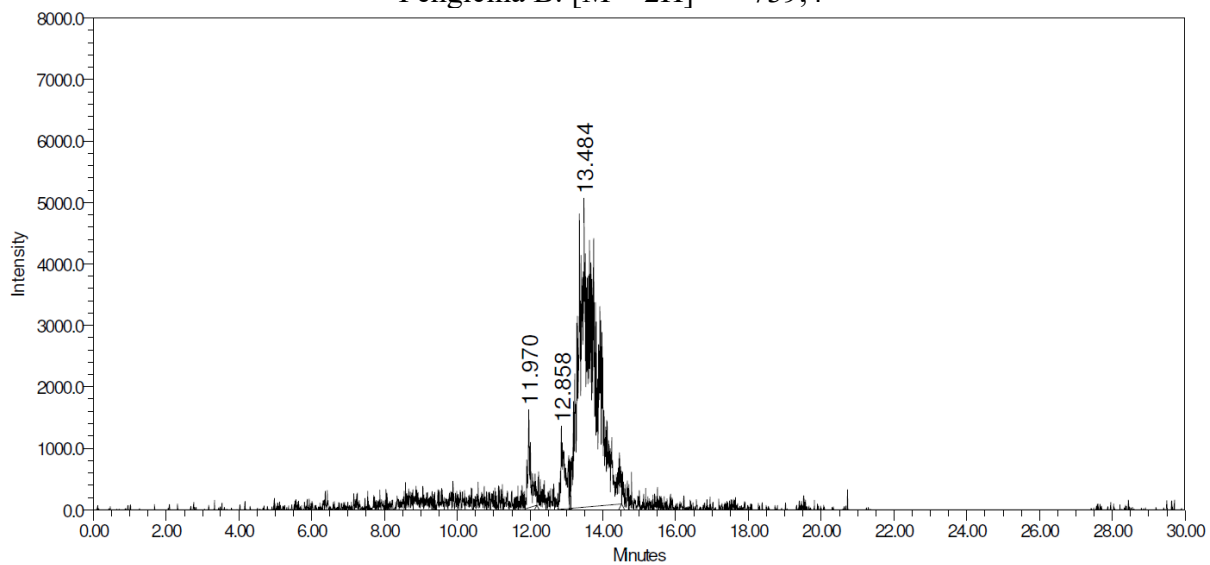


**ANEXO O – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO  
ACETATO 505**

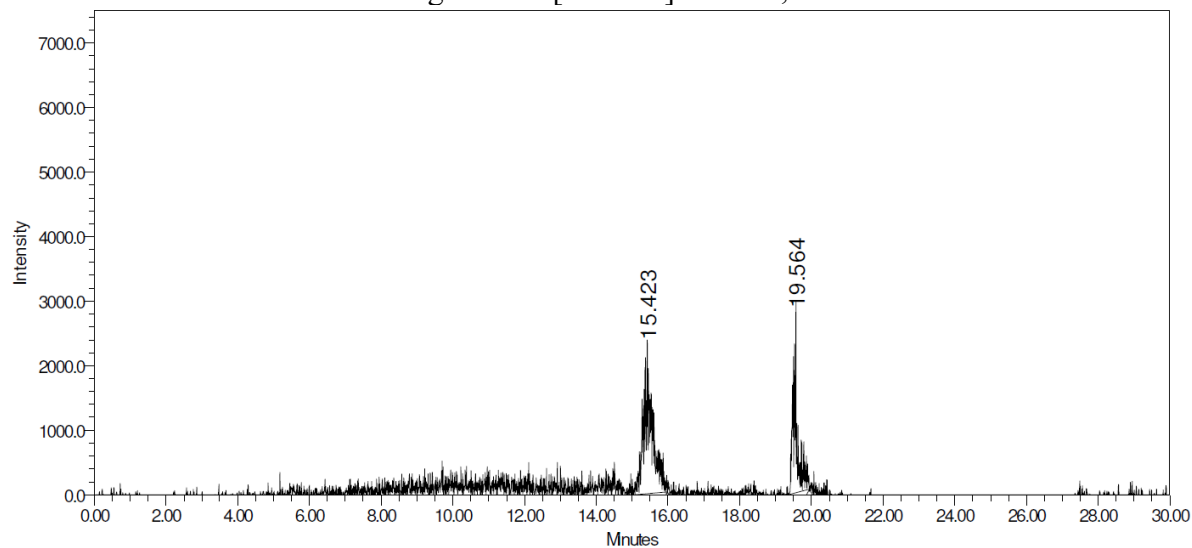


**ANEXO P – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO  
ACETATO 506**

Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 739,4$

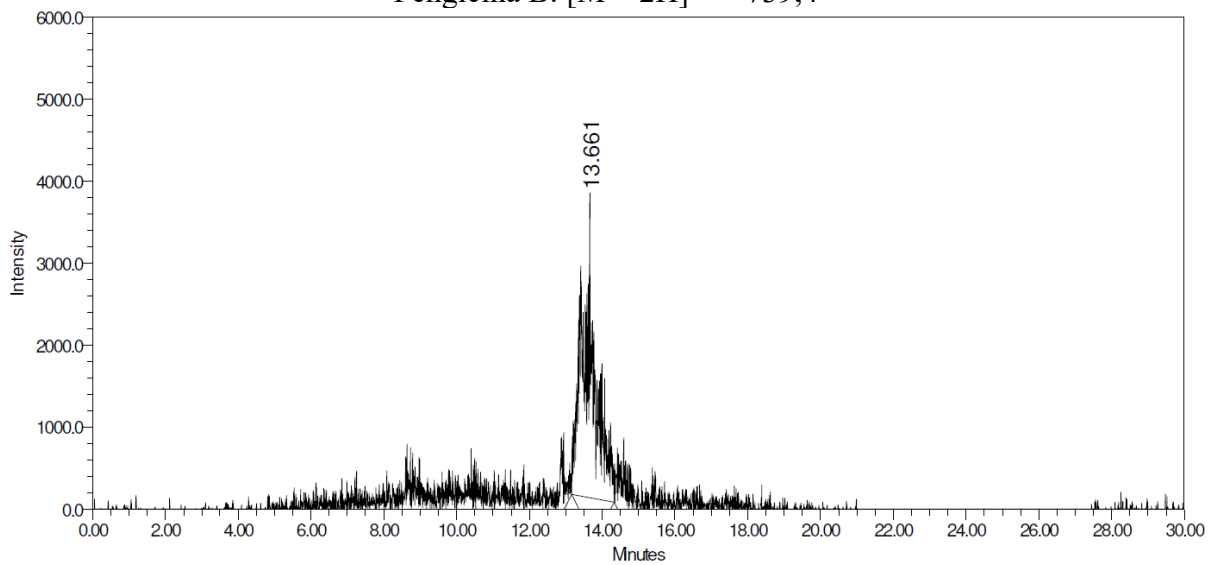


Fengicina A:  $[M + 2H]^{2+} = 732,4$

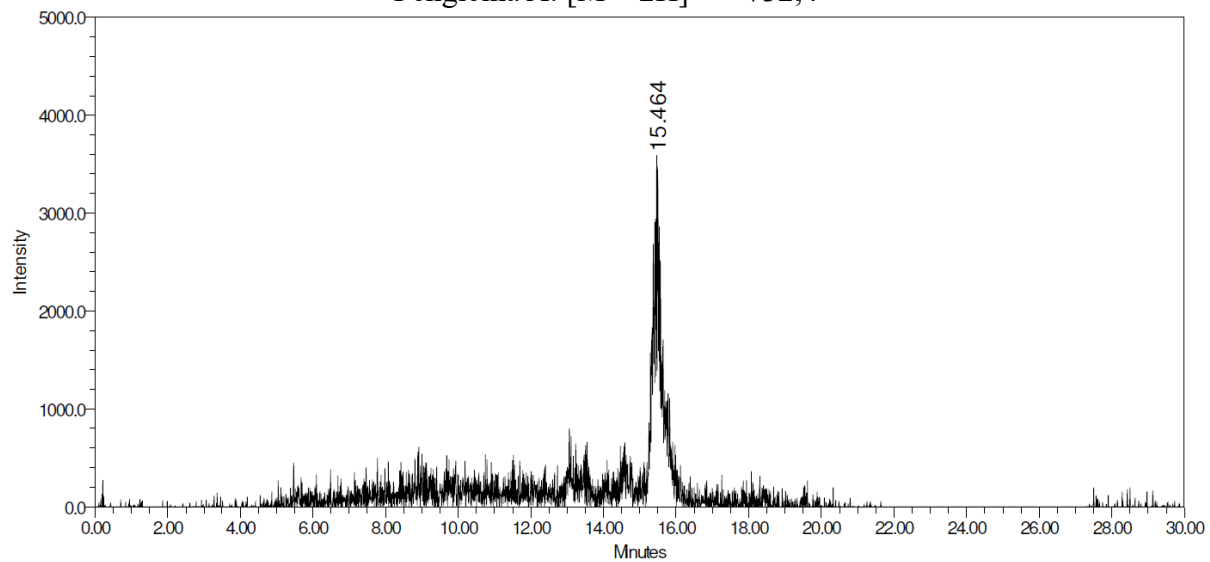


**ANEXO Q – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO  
ACETATO 507**

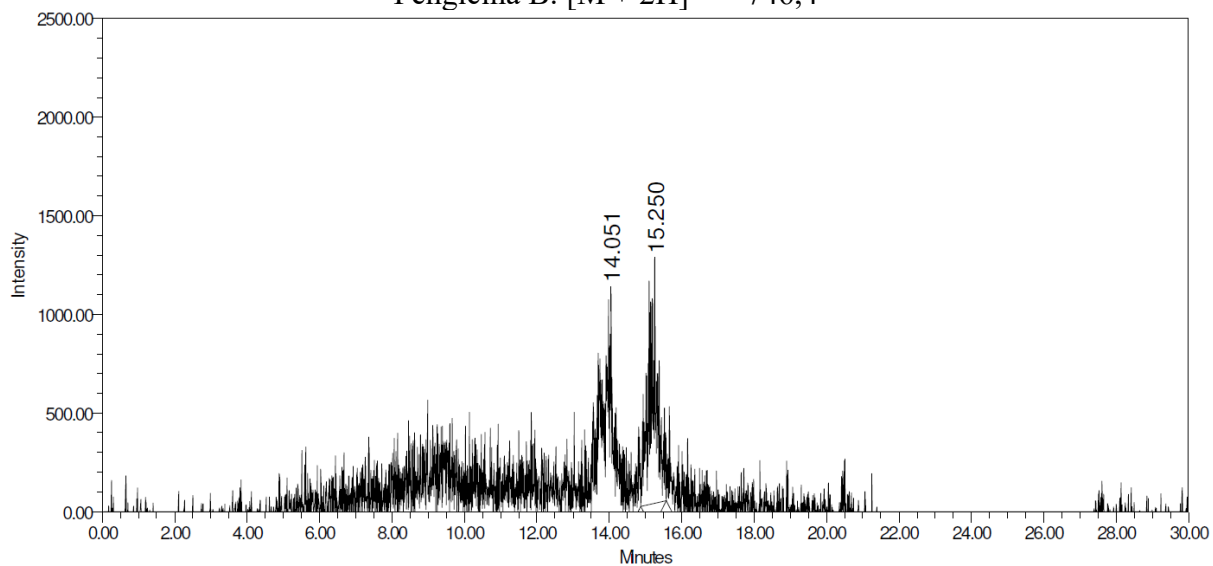
Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 739,4$



Fengicina A:  $[M + 2H]^{2+} = 732,4$

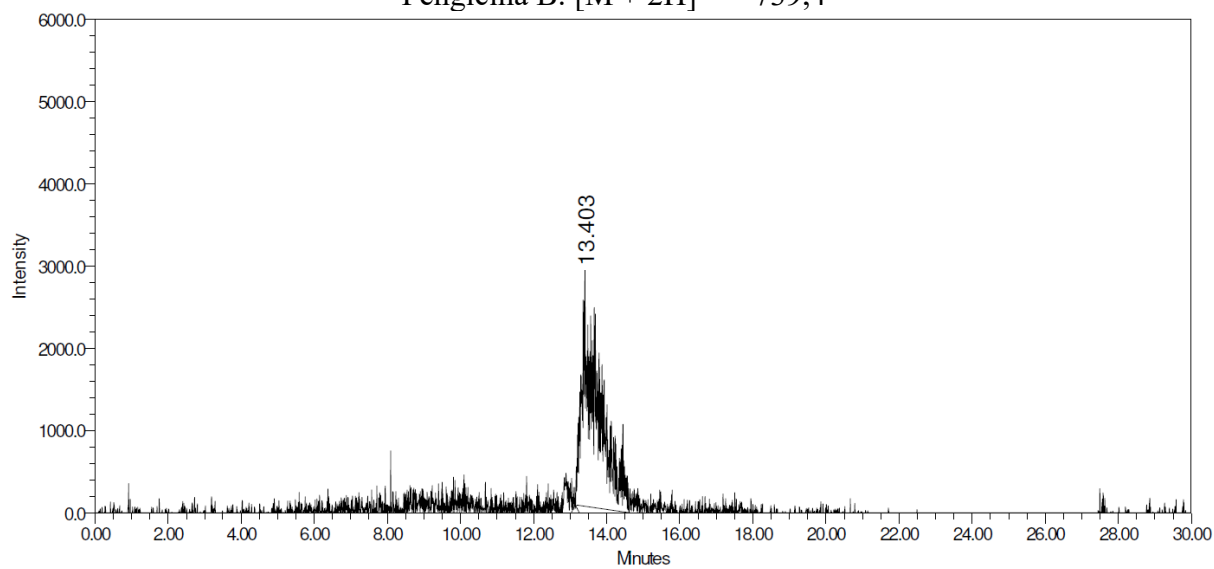


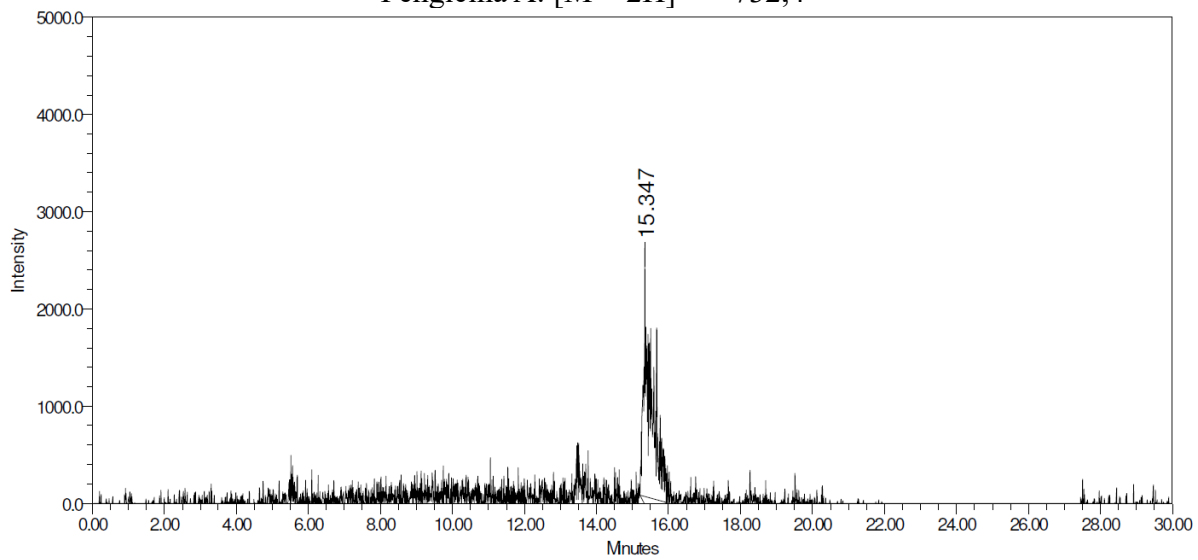
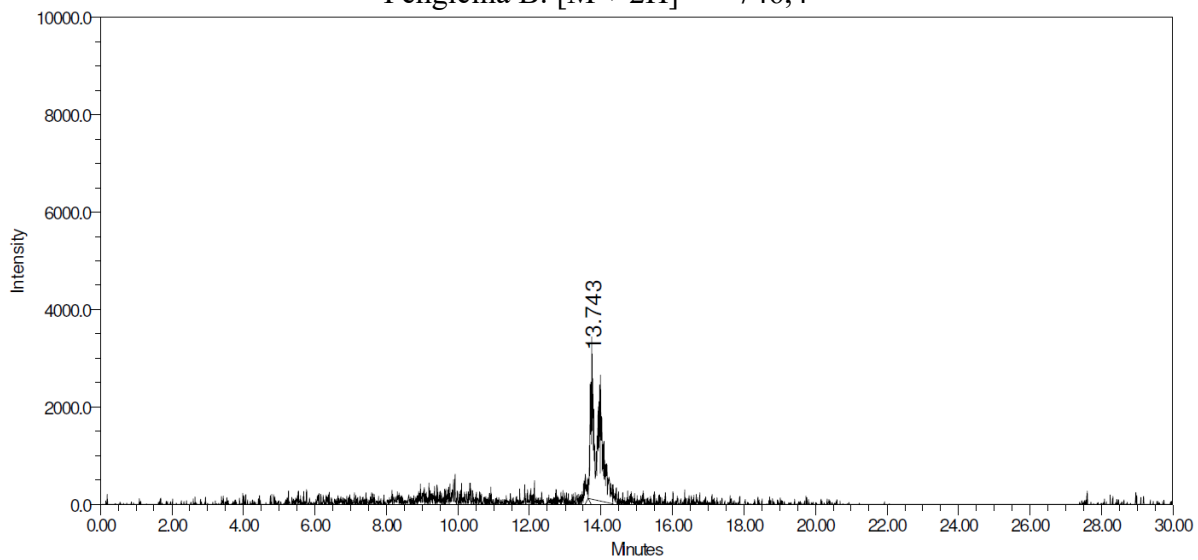
Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 746,4$



**ANEXO R – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO  
ACETATO 508**

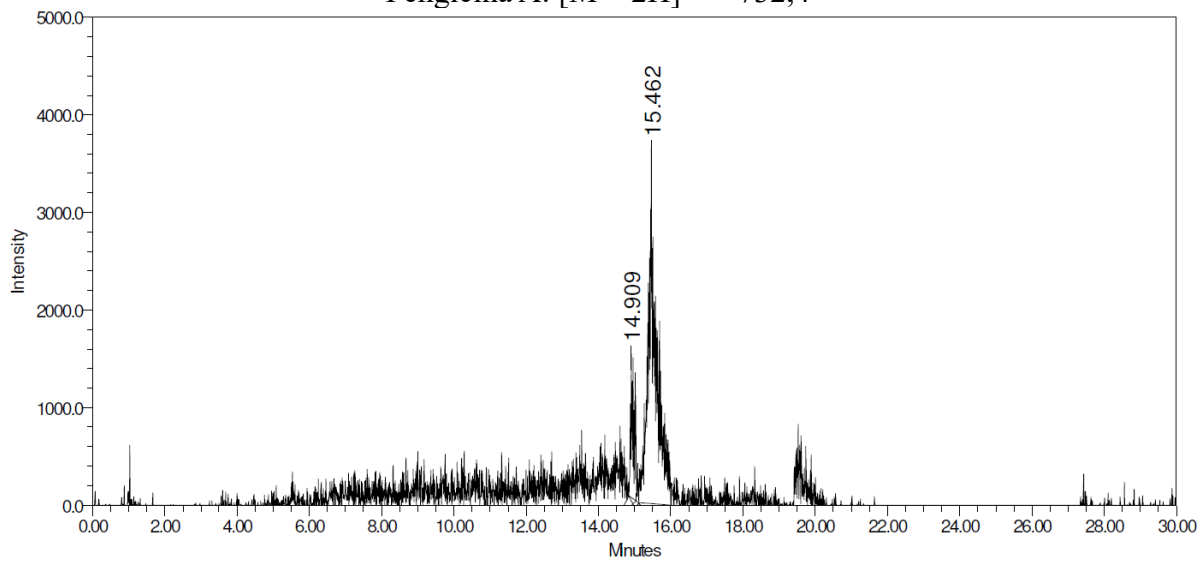
Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 739,4$



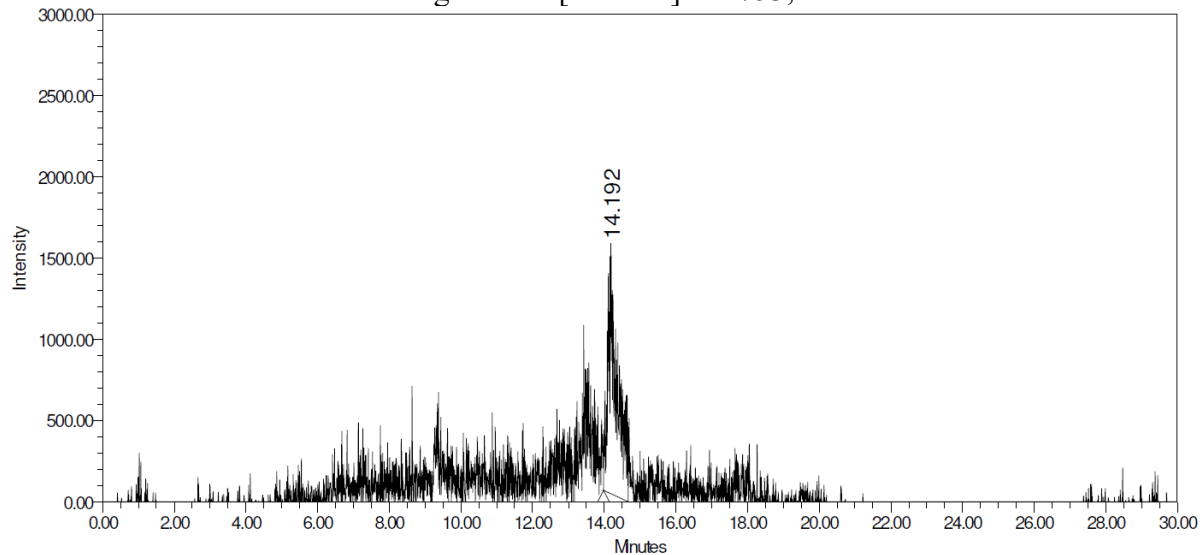
Fengicina A:  $[M + 2H]^{2+} = 732,4$ Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 746,4$ 

**ANEXO S – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO  
ACETATO 510**

Fengicina A:  $[M + 2H]^{2+} = 732,4$



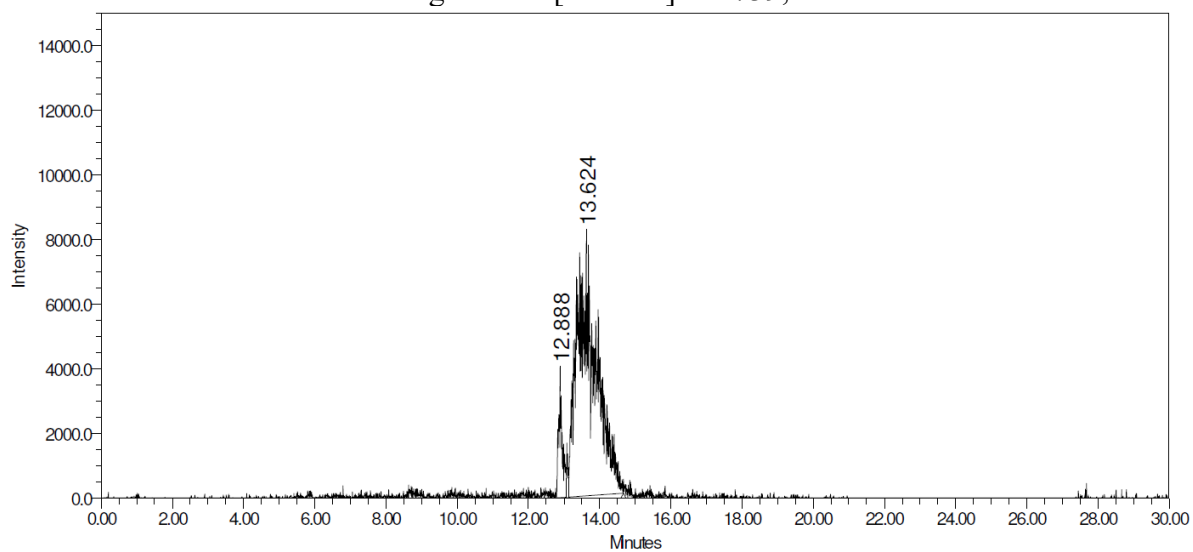
Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 753,4$



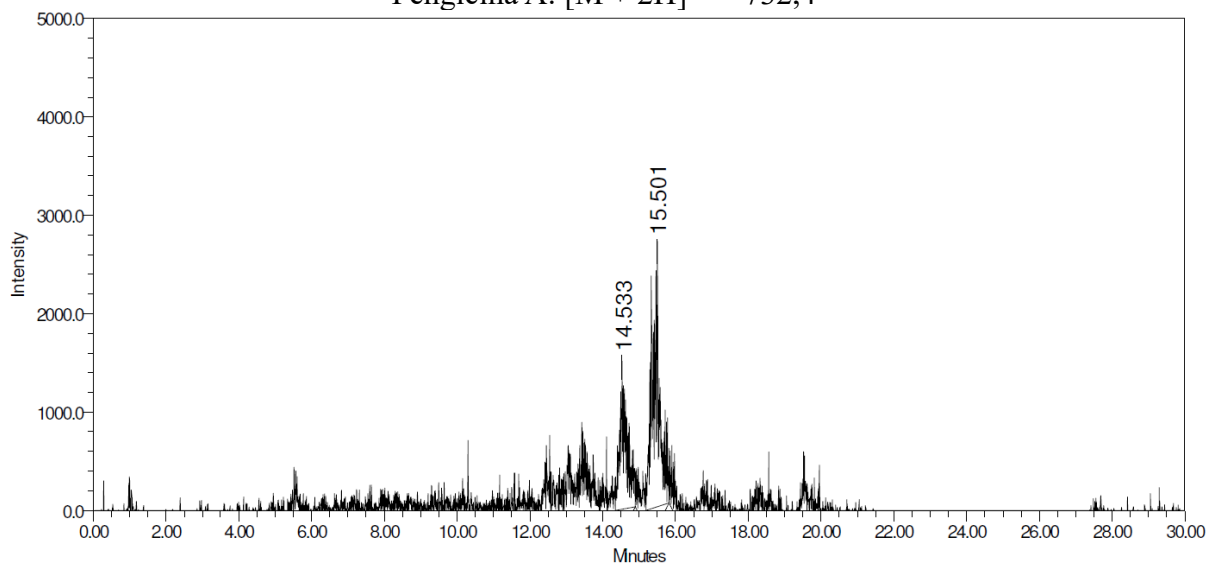


**ANEXO T – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO  
ACETATO 511**

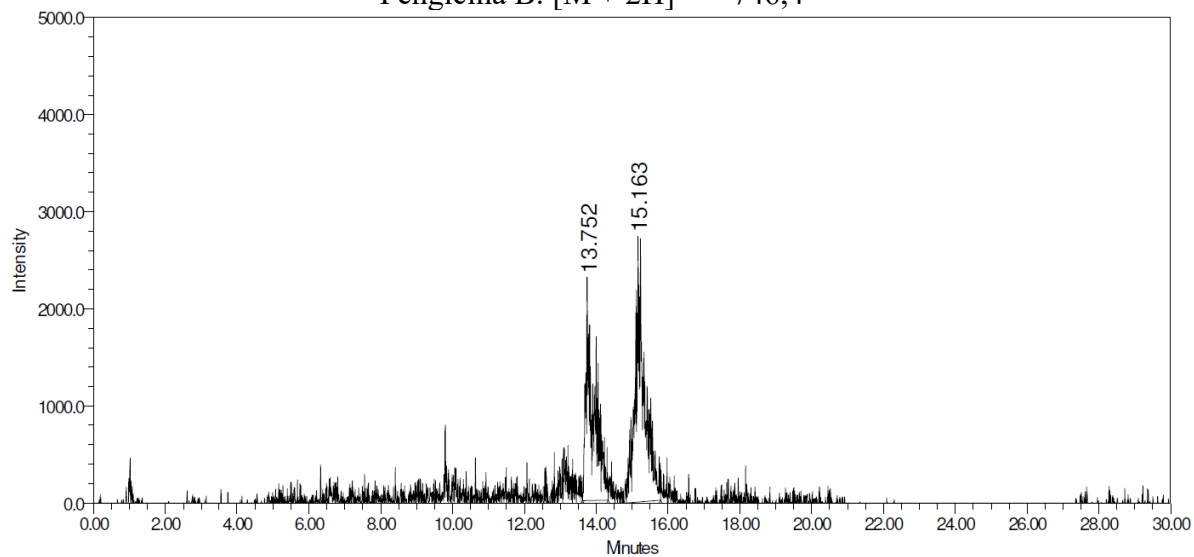
Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 739,4$



Fengicina A:  $[M + 2H]^{2+} = 732,4$

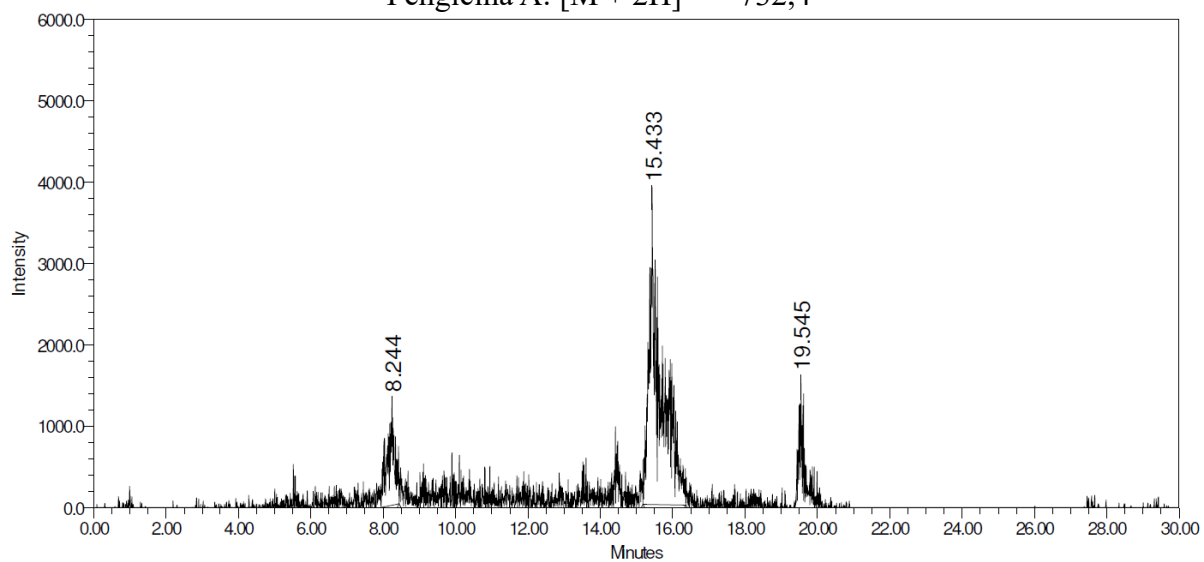


Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 746,4$



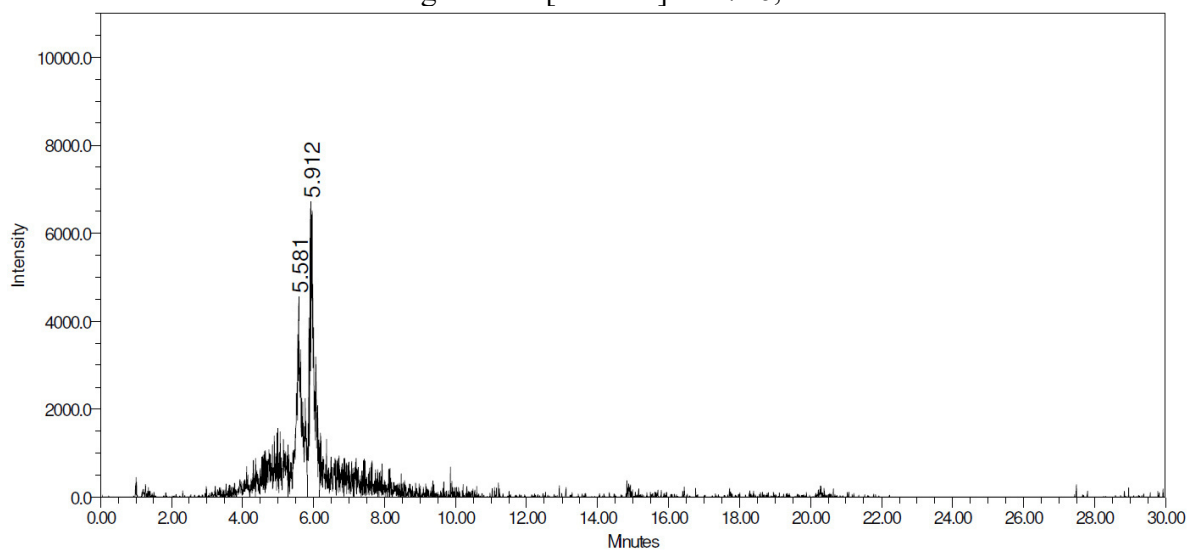
## ANEXO U – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO ACETATO 512

Fengicina A:  $[M + 2H]^{2+} = 732,4$



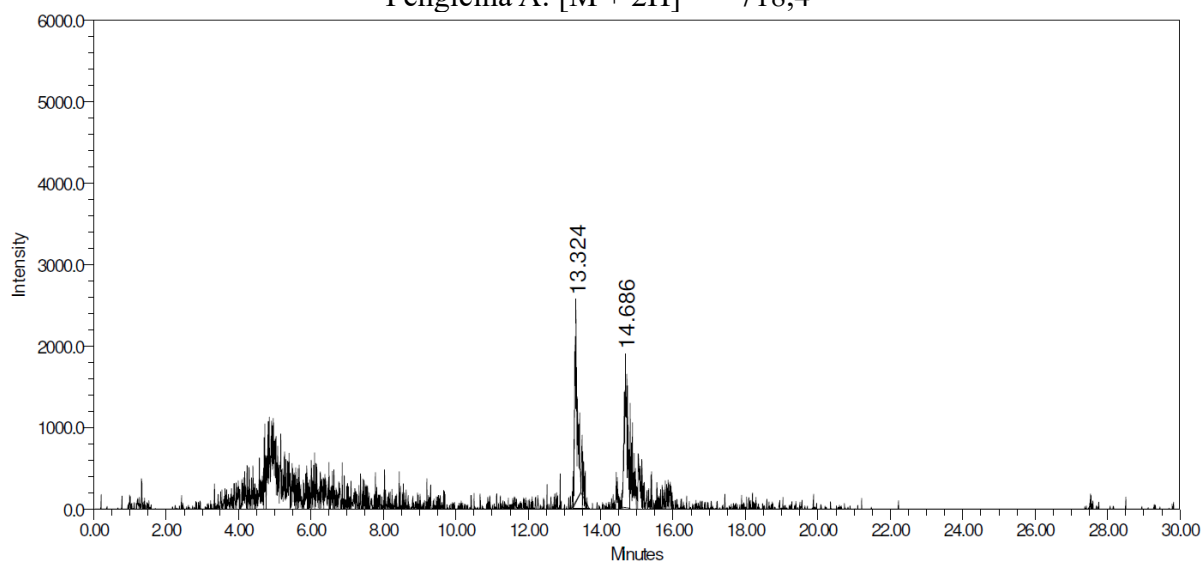
**ANEXO V – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO  
LIPOPEPTÍDEO NÃO-INOCULADO**

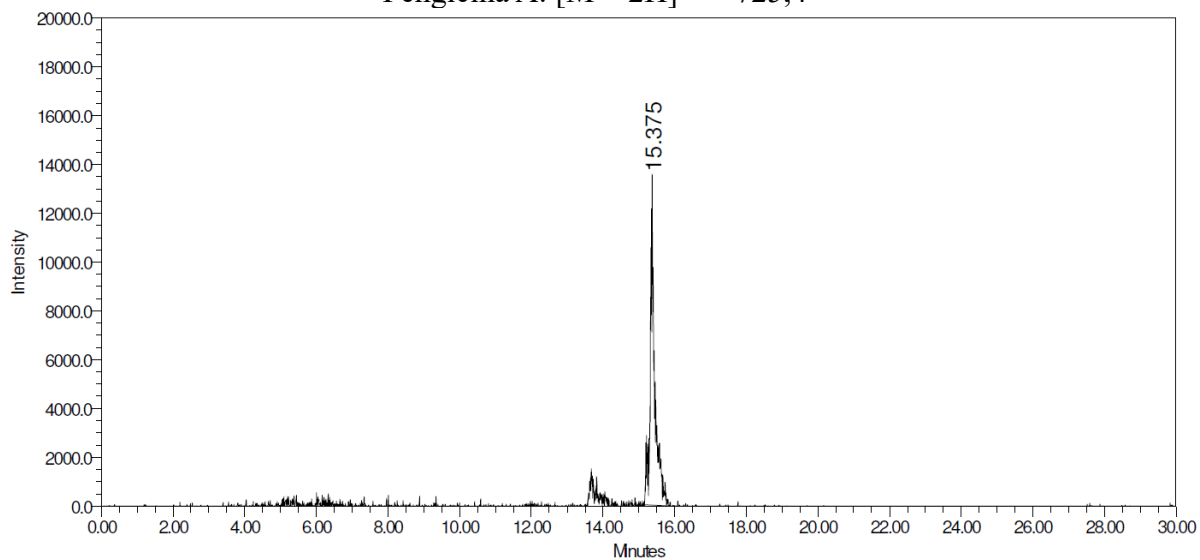
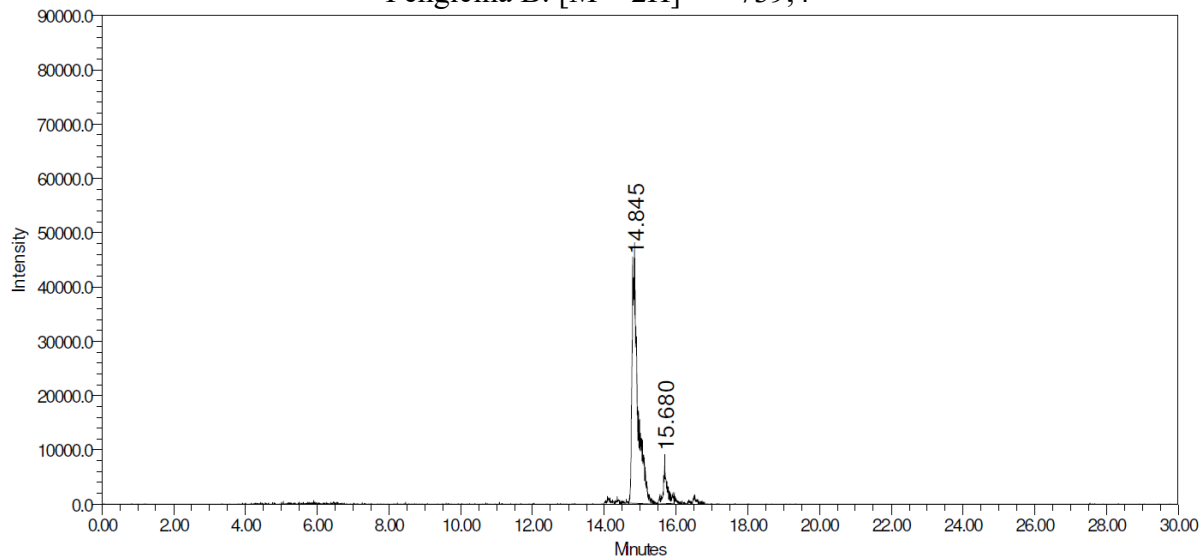
Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 746,4$

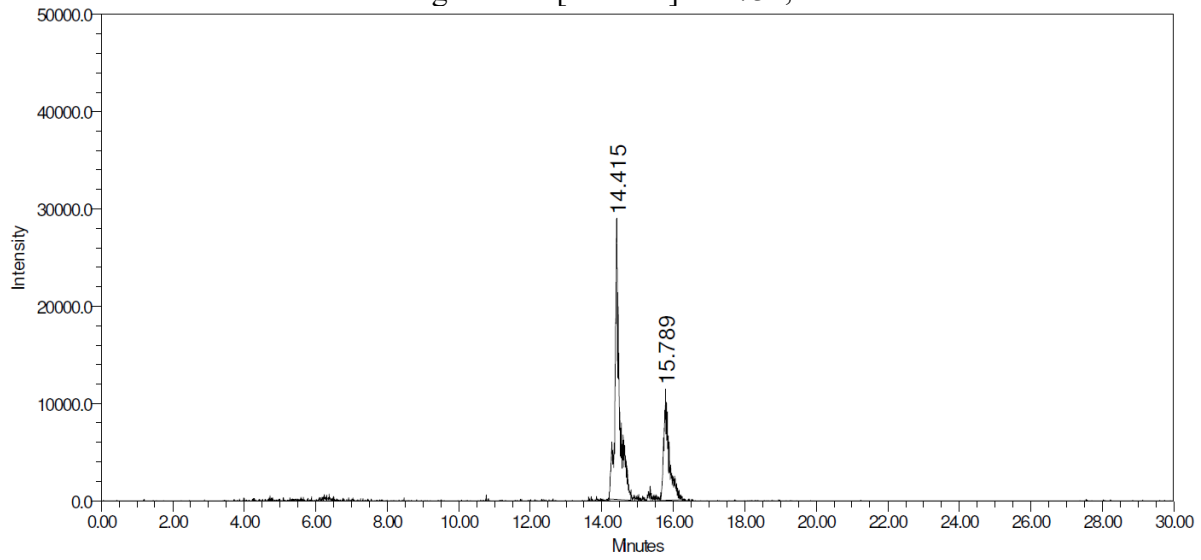
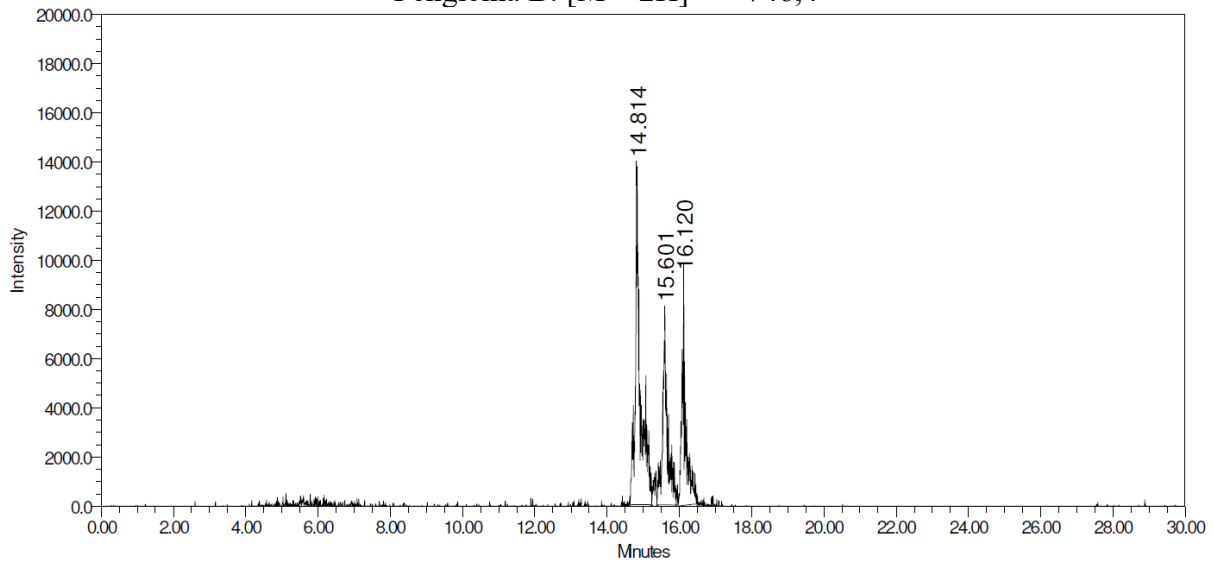


**ANEXO W – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO  
LIPOPEPTÍDEO 501**

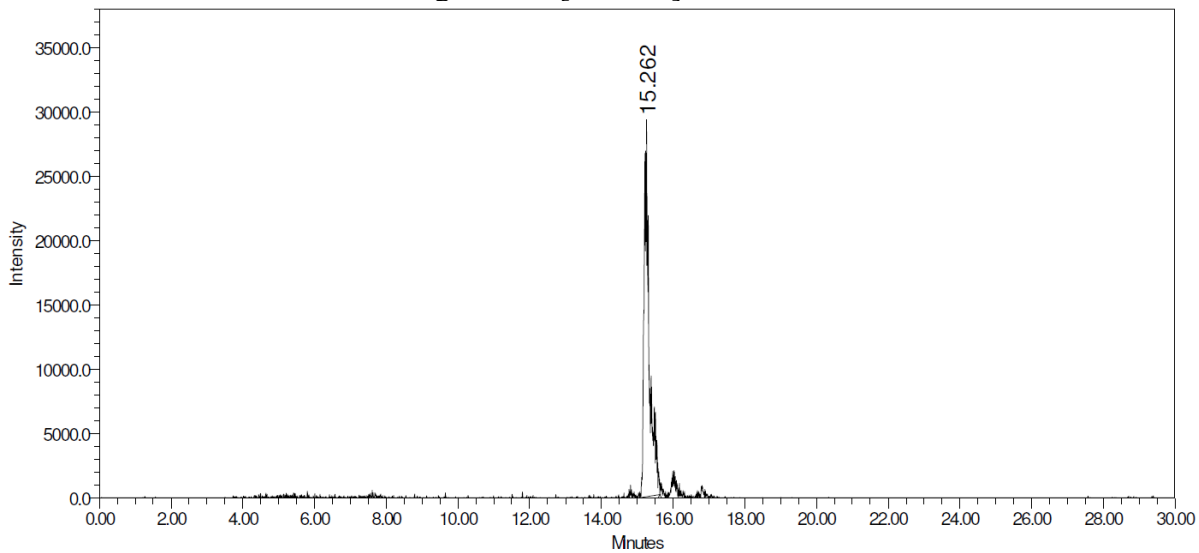
Fengicina A:  $[M + 2H]^{2+} = 718,4$



Fengicina A:  $[M + 2H]^{2+} = 725,4$ Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 739,4$ 

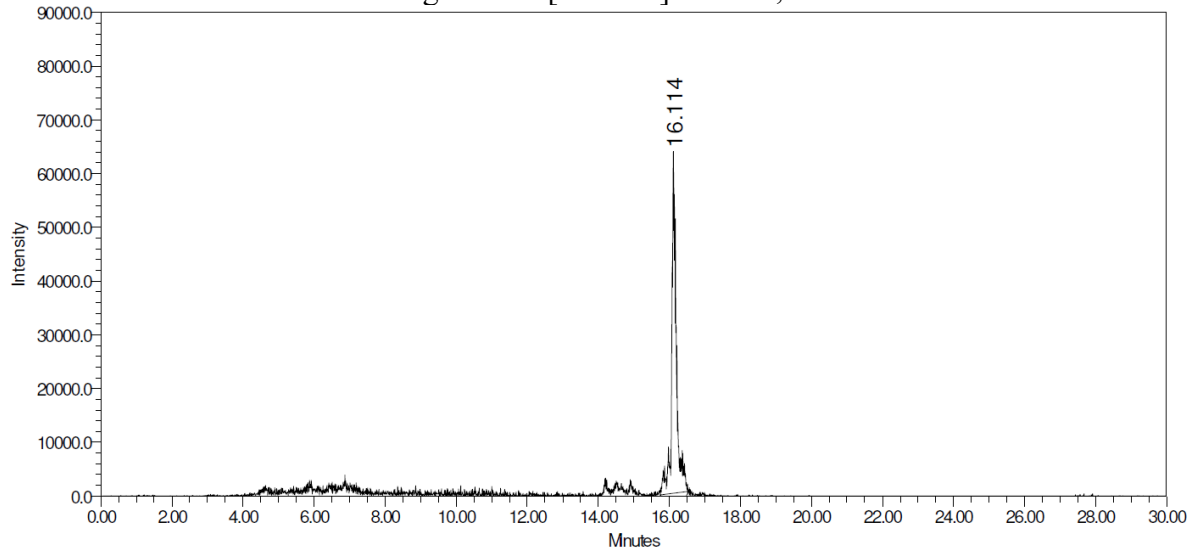
Fengicina A:  $[M + 2H]^{2+} = 732,4$ Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 746,4$ 

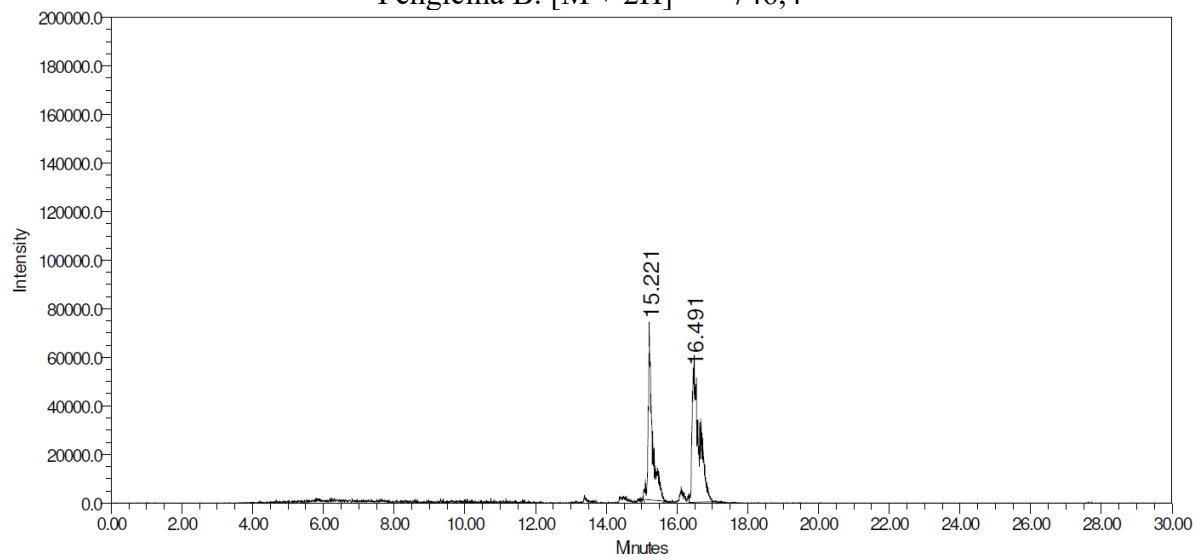
Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 753,4$



**ANEXO X – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MÉTODO SIM DO EXTRATO  
LIPOPEPTÍDEO 512**

Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 739,4$



Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 746,4$ Fengicina B:  $[M + 2H]^{2+} = 753,4$ 