



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**CAROLINE GONDIM DE SOUZA**

**PRODUÇÃO E PROCESSO DE *DOWNSTREAM* DE LIPOPEPTÍDEOS  
FUNGICIDAS PRODUZIDOS PELO *Bacillus subtilis* CNPMS 22**

**FORTALEZA**

**2019**

CAROLINE GONDIM DE SOUZA

PRODUÇÃO E PROCESSO DE *DOWNSTREAM* DE LIPOPEPTÍDEOS  
FUNGICIDAS PRODUZIDOS PELO *Bacillus subtilis* CNPMS 22

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Dr. Edy Sousa de Brito.

Coorientador: Dr. Kirley Marques Canuto.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S237p Souza, Caroline Gondim.

Produção e processo de *Downstream* de lipopeptídeos fungicidas produzidos pelo *Bacillus subtilis* CNPMS 22/ Caroline Gondim Souza. – 2019.

109 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito.

Coorientação: Prof. Dr. Kirley Marques Canuto.

1. Lipopeptídeos. 2. Iturina. 3. Fengicina. 4. Surfactina. 5. *Bacillus subtilis*. I. Título.

CDD 660

---

CAROLINE GONDIM DE SOUZA

PRODUÇÃO E PROCESSO DE *DOWNSTREAM* DE LIPOPEPTÍDEOS  
FUNGICIDAS PRODUZIDOS PELO *Bacillus subtilis* CNPMS 22

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 26 / 03/ 2019

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Edy Sousa de Brito (Orientador)  
Embrapa Agroindústria Tropical

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Tigressa Helena Soares Rodrigues  
Universidade Estadual Vale do Acaraú-Campus Sobral

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Sueli Rodrigues  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Pesquisador Dr. Guilherme Julião Zocolo  
Embrapa Agroindústria Tropical

*Dedico a minha família – Minha mãe, meu pai e  
ao meu irmão- que me deram amor e apoio  
incondicional para a realização desse sonho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre ter iluminado meus caminhos e por ter me proporcionado força e coragem durante toda a minha jornada de trabalho.

Aos meus pais, Lucia e José, pelo grande amor, carinho, estímulo, ensinamentos e dedicação em todas as etapas da minha vida.

Ao meu irmão Ronalty e minha cunhada Jamille, por sempre acreditar em minha capacidade e por todo apoio, carinho e por me levarem em suas viagens para eu espairecer um pouquinho dessa vida árdua de doutoranda.

Ao meu orientador, Dr. Edy Sousa de Brito, pela paciência, amizade, confiança em meu trabalho e conhecimentos compartilhados, de grande importância para minha vida acadêmica e profissional.

Ao meu coorientador, Dr. Kirley Canuto, pela confiança em meu trabalho, amizade e conhecimentos compartilhados.

Ao pesquisador Dr. Guilherme Julião Zocolo pela amizade, ajuda, dedicação, conhecimentos compartilhados e empenho em me auxiliar no desenvolvimento de um dos artigos publicados.

Ao pesquisador Dr. Cleberson Fernandes, que mesmo doente foi para a bancada junto comigo e me auxiliou no desenvolvimento de um dos artigos. Obrigada pela ajuda, dedicação, empenho e pelos conhecimentos compartilhados. E obrigado também ao pesquisador Dr. Fabio Barbieri pela ajuda, dedicação, empenho e pelos conhecimentos compartilhados.

A Dr<sup>a</sup>. Tigressa Helena Soares Rodrigues, Dr<sup>a</sup>. Valderez Pontes Rocha, Dr<sup>a</sup>. Sueli Rodrigues, Dr. Ivanildo José da Silva Junior e ao Dr. Guilherme Zocolo por aceitarem o convite para participar da banca de qualificação e defesa, obrigada pelas considerações e ensinamentos compartilhados.

À Embrapa Agroindústria Tropical que só tenho a agradecer pela oportunidade e pela experiência profissional adquirida nestes 10 anos sendo bolsista da unidade. Obrigada a todos os profissionais que cruzaram o meu caminho e contribuíram para o meu crescimento profissional.

Aos técnicos do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais: Lorena e Paulo por toda ajuda, paciência e conhecimentos compartilhados. A Dona Rose pela dedicação em levar nosso cafezinho e em manter o nosso cantinho de estudo sempre organizado.

A técnica do Laboratório de Fitopatologia: Samara Assunção por toda a ajuda nos experimentos, a dedicação, empenho e conhecimentos compartilhados.

A técnica do Laboratório de Bioprocessos: Natalia Moura por toda a ajuda, dedicação, empenho e conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais: Marcelo, Oiram, Jhony, Bruno, Liana, Camila, Fatíma, Kaline, Lícia, Amanda, Thais, Sheila, Yuri e Regis que tornaram minha jornada árdua de doutorado mais leve e divertida. Saudades sentirei de todas as conversas e risadas jogadas ao vento na copa e na salinha dos bolsistas; de tudo o que vivemos e passamos neste tempo. Obrigada Jovens!

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química e a todos os professores, pela oportunidade de realização do doutorado e pelos ensinamentos transmitidos.

À turma de Doutorado, em especial a Marcia Lacerda, Marcelo, Paula Luciana, Nádia e Bruno, pelo carinho, amizade, companheirismo, pelas palavras de incentivo principalmente durante os momentos mais difíceis e energia positiva construída e irradiada durante toda nossa trajetória.

À Funcap e CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível o cumprimento de mais esta etapa em minha vida.

“Todas as grandes conquistas humanas  
vieram daquilo que parecia impossível”

Charles Chaplin



## RESUMO

A busca por produtos naturais com capacidade de controlar fitopatógenos é uma necessidade crescente devido à preocupação tanto pela segurança alimentar quanto pelo meio ambiente. Neste contexto, o *Bacillus subtilis* se destaca devido ao seu potencial em produzir uma grande variedade de lipopeptídeos com atividade antifúngica. Portanto, o objetivo geral do presente trabalho foi quantificar, purificar e verificar a ação fungicida dos lipopeptídeos produzidos pelo *B. subtilis* CNPMS 22. Para tal, inicialmente foi desenvolvido e validado um método de quantificação dos lipopeptídeos em cromatografia de ultra performance com detector quadrupolo (UPLC-QDA) com o modo de monitoramento de íons (SIM). O modo SIM foi utilizado para detecção e quantificação dos lipopeptídeos exibindo íons  $[M + H]^+$  para as iturinas e surfactinas e  $[M + 2H]^{2+}$  para as fengicinas. Os íons monitorados foram:  $m/z$  1043,5; 1057,5; 1071,5; 718,3; 725,4; 739,4; 732,4; 746,4; 753,4; 1008,6; 1022,6 e 1036,6. Os compostos foram separados por cromatografia líquida de fase reversa utilizando uma coluna analítica C<sub>18</sub> num tempo total de 19 min. Posteriormente, foi realizado um estudo de ampliação de escala de fracionamento das famílias de lipopeptídeos utilizando a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), tanto na escala semi-preparativa como na escala preparativa. Também foi avaliado a utilização da partição líquido-líquido na separação dos compostos e verificou-se a viabilidade de associação da partição com a HPLC, tanto em escala semi-preparativa e como em escala preparativa. Para os testes de ampliação de escala com HPLC diferentes cargas foram utilizadas (20, 40, 60 e 80 mg). Nesta etapa foram avaliados o consumo de solvente, produtividade e rendimento. Na partição foi realizado testes de proporções de solvente visando determinar a condição ideal para a separação dos lipopeptídeos. Em seguida, foi realizado um estudo para avaliar a atividade fungicida das famílias de lipopeptídeos e do extrato bruto, contra o *Colletotrichum musae* (agente da antracnose), *Fusarium pallidoroseum* (agente da fusariose) e o *Lasiodiplodia caatigensis* (agente da resinose), também foi verificada a concentração inibitória mínima (CIM) e a citotoxicidade. Os resultados mostraram que o método analítico de quantificação proposto foi capaz de quantificar simultaneamente 12 isoformas e séries homólogas de famílias lipopeptídeos em amostras biológicas. Com relação ao estudo de ampliação de escala, os resultados indicaram que a ampliação da carga de injeção pode ser realizada até 60 mg, em ambas as escalas. Comparando os resultados obtidos entre as escalas, notou-se que na escala preparativa o consumo de solvente foi 4 vezes maior (4,35 mL mg<sup>-1</sup>) quando comparado ao da escala semi-preparativa (1 mL mg<sup>-1</sup>), porém sua produtividade foi 2 vezes maior (0,0084 kg dia<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>), isso para a carga de 60 mg. Resultados satisfatórios foram apresentados pela partição líquido-líquido na obtenção individual da família de surfactina. O estudo da associação da HPLC com a partição líquido-líquido revelou que a associação é vantajosa quando se trabalha em escala preparativa e particionando, inicialmente, 20 mg do extrato bruto. Já os resultados da avaliação da atividade fungicida mostrou que a família de fengicina é ideal para o combate ao agente da fusariose, pois apresentou a menor CIM, com 0,0002 mg mL<sup>-1</sup> e a família de surfactina para o combate ao agente da antracnose, pois apresentou a menor CIM, com 0,0003 mg mL<sup>-1</sup>. A baixa citotoxicidade das frações revela um resultado positivo para a aplicabilidade dos lipopeptídeos no controle de fitopatógenos, uma vez que, não afetaram as células humanas. Diante do exposto, pode-se concluir que o *B. subtilis* CNPMS 22 fornece um bio-recurso alternativo para o controle de fitopatógenos, pois os lipopeptídeos produzidos apresentam atividade antifúngica, podendo ser utilizados com um defensivo natural.

**Palavras-chave:** Lipopeptídeos; Iturina; Fengicina; Surfactina; *Bacillus subtilis*.

## ABSTRACT

The search for natural products capable of controlling phytopathogens is a growing need because of concern for both food safety and the environment. In this context, *Bacillus subtilis* stands out due to its potential in producing a large variety of lipopeptides with antifungal activity. Therefore, the general objective of the present work was to quantify, purify and verify the fungicidal action of the lipopeptides produced by the *B. subtilis* CNPMS 22. A lipopeptide quantification method was initially developed and validated in ultra-performance chromatography with a quadrupole detector (UPLC-QDA) with the ion monitoring mode (SIM). SIM mode was used to detect and quantify lipopeptides exhibiting  $[M + H]^+$  ions for iturins and surfacins and  $[M + 2H]^{2+}$  for fengicins. The monitored ions were:  $m/z$  1043.5; 1057.5; 1071.5; 718.3; 725.4; 739.4; 732.4; 746.4; 753.4; 1008.6; 1022.6 and 1036.6. The compounds were separated by reverse phase liquid chromatography using a  $C_{18}$  analytical column in a total time of 19 min. Later, a scale-up study of the fractionation of lipopeptide families using high-performance liquid chromatography (HPLC) was performed, both on the semi-preparative scale and the preparative scale. The use of the liquid-liquid partition in the separation of the compounds was also evaluated and the feasibility of partitioning with the HPLC was verified, both on a semi-preparative scale and on a preparative scale. For scaling tests with HPLC different loads were used (20, 40, 60 and 80 mg). In this stage the solvent consumption, productivity and yield were evaluated. In the partition was carried out tests of proportions of solvent aiming to determine the ideal condition for the separation of lipopeptides. Then, a study was carried out to evaluate the fungicidal activity of lipopeptide families and crude extract against *Colletotrichum musae* (anthracnose agent), *Fusarium pallidoroseum* (fusariosis agent) and *Lasiodiplodia caatigensis* (resting agent agent). minimum inhibitory concentration (MIC) and cytotoxicity were verified. The results showed that the proposed analytical method of quantification was able to simultaneously quantify 12 isoforms and homologous series of lipopeptide families in biological samples. Regarding the scaling-up study, the results indicated that the magnification of the injection load can be performed up to 60 mg, in both scales. Comparing the results obtained between the scales, it was observed that in the preparative scale the solvent consumption was 4 times higher ( $4.35 \text{ mL mg}^{-1}$ ) when compared to the semi-preparative scale ( $1 \text{ mL mg}^{-1}$ ). productivity was 2 times higher ( $0.0084 \text{ kg day}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ), this for the 60 mg load. Satisfactory results were presented by the liquid-liquid partition in the individual surfactin family. The study of the association of HPLC with the liquid-liquid partition revealed that the association is advantageous when working on a preparative scale and initially partitioning 20 mg of the crude extract. The results of the evaluation of the fungicidal activity showed that the fengicin family is ideal for combating the fusariosis agent, since it presented the lowest MIC with  $0.0002 \text{ mg mL}^{-1}$  and the surfactin family to combat the anthracnose agent, because it presented the lowest MIC, with  $0.0003 \text{ mg mL}^{-1}$ . The low cytotoxicity of the fractions reveals a positive result for the applicability of the lipopeptides in the control of phytopathogens, since they did not affect the human cells. In view of the above, it can be concluded that *B. subtilis* CNPMS 22 provides an alternative bio-resource for the control of phytopathogens, since the lipopeptides produced have antifungal activity and can be used with a natural defensive agent.

**Keywords:** Lipopeptides; Iturin; Fengicin; Surfactin; *Bacillus subtilis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Subdivisões dos lipopeptídeos produzidos por <i>Bacillus subtilis</i> .....	24
Figura 2 -	Estrutura molecular da iturina A.....	25
Figura 3 -	Estrutura molecular da fengicina.....	26
Figura 4 -	Estrutura molecular da surfactina.....	26
Figura 5 -	Fluxograma geral das etapas da tese.....	43
Figura 6 -	Estruturas das principais classes de lipopeptídeos de <i>Bacillus subtilis</i> : iturina A (a), fengicina (b) e surfactina (c).....	46
Figura 7 -	Os espectros SIM combinados de UPLC-QDA, apresentando 12 lipopéptidos de <i>Bacillus subtilis</i> . (A) Iturina A2 m / z 1043,5. (B) Iturina A3-A5 m / z 1057,5. (C) Iturina m / z 1071,5. (D) Fengicina A m / z 718,3. (E) Fengicina A m / z 725,4. (F) Fengicina B m / z 739,4. (G) Fengicina A m / z 732,4. (H) Fengicina B m / z 746,4. (I) Fengicina B m / z 753,4. (J) Surfactina m / z 1008,6. (K) Surfactina m / z 1022,6. (L) surfactina m / z 1036,6.....	54
Figura 8 -	Concentração de iturina, fengicina e surfactina presentes no caldo de três diferentes fermentações <i>Bacillus subtilis</i> CNPMS 22.....	59
Figura 9 -	Cromatograma obtido na HPLC em escala semi-preparativa (carga de 20mg), e os espectros de massas de cada fração isolada.....	69
Figura 10 -	Cromatogramas da ampliação de escala com a coluna semi-preparativa. (a) carga de 20 mg; (b) carga de 40 mg; (c) carga de 60 mg e (d) 80 mg.	71
Figura 11 -	Rendimento total em massa na escala semi-preparativa.....	73
Figura 12 -	Cromatogramas da escala preparativa. (a) carga de injeção de 20 mg; (b) carga de injeção de 40 mg; (c) carga de injeção de 60 mg e (d) carga de injeção de 80 mg.....	74
Figura 13 -	Rendimento total em massa na escala preparativa.....	76
Figura 14 -	Cromatogramas UPLC-QTOF-MS <sup>E</sup> da partição líquido-líquido. (a) sistema de solventes na proporção 2:8:2:8 (v/v/v/v) e (b) sistema de solventes na proporção 2:8:3:7 (v/v/v/v).....	78
Figura 15 -	Ilustração do halo de crescimento do controle negativo (a), controle positivo (b) e da iturina (c) em 96 horas de experimento.....	88
Figura 16 -	Halo de crescimento do <i>Colletotrichum Musae</i> nas diluições trabalhadas do teste de CIM. (a) Extrato bruto; (b) Fengicina; (c) Iturina e (d) Surfactina.....	96

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sequência de peptídeos e cadeia de ácidos graxos das diferentes variantes de cada família de lipopeptídeos de <i>Bacillus spp.</i> ....	23
Tabela 2 -	Condições fermentativas para a produção de iturina e fengicina.....	31
Tabela 3 -	Condições fermentativas para a produção de surfactina.....	32
Tabela 4 -	Massa dos lipopeptídeos (UPLC-qTOF-MS) e íons de monitoramento correspondentes (UPLC-QDA-SIM) com janelas de tempo.....	49
Tabela 5 -	Avaliação estatística do estudo de linearidade da análise de lipopeptídeos de <i>Bacillus subtilis</i> por UPLC-QDA-SIM.....	56
Tabela 6 -	Precisão intra e inter dia dos lipopeptídeos em matrizes biológicas (coeficiente de variação - CV%).....	57
Tabela 7 -	Limites de detecção e quantificação de lipopeptídeos (método baseado no desvio padrão).....	58
Tabela 8 -	Consumo de solvente e produtividade do fracionamento dos lipopeptídeos em diferentes cargas de injeção (20, 40, 60 e 80 mg) de extrato bruto de lipopeptídeos na escala semi-preparativa.....	72
Tabela 9 -	Consumo de solvente e produtividade do fracionamento dos lipopeptídeos em diferentes cargas de injeção (20, 40, 60 e 80 mg) de extrato bruto de lipopeptídeos na escala preparativa.....	75
Tabela 10 -	Valor de k para a razão de (1:9:3:7) (v/v/v/v).....	77
Tabela 11 -	Valor de k para a razão de (5:5:5:5) (v/v/v/v).....	77
Tabela 12 -	Quantidade de solvente utilizado no HPLC.....	80
Tabela 13 -	Quantidade de solvente orgânico utilizado na partição líquido-líquido para a proporção 2:8:2:8 (v/v/v/v).....	80
Tabela 14 -	Economia total de solvente com a associação da HPLC com a partição líquido-líquido.....	82
Tabela 15 -	Potencial de atividade antifúngica dos lipopeptídeos do pré-teste, na concentração de $10^{-2}$ mg mL <sup>-1</sup> , para os diferentes fitopatógenos testados.....	91
Tabela 16 -	CIM e CL 50 das famílias de lipopeptídeos contra os fungos: <i>Fusarium pallidoroseum</i> e <i>Colletotrichum muase</i> .....	93
Tabela 17 -	Média do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras na concentração única de 100 µg/mL (extrato) e 10 µg/mL (composto isolado).....	97

## LISTA DE ABREVEATURAS

CIM	Concentração inibitória mínima
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal de 50 % da colônia
CV	Coefficiente de variação
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	Internacional conference on harmonization
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento
<i>SIM</i>	Monitoramento de íon
UPLC-QDA- <i>SIM</i>	Cromatografia de ultra performance com detector quadrupolo com o monitoramento de íons
UPLC-QTOF-MS <sup>E</sup>	Cromatografia de líquida de ultra performance com detector quadrupolo e tempo de vôo acoplado a espectrometria de massas

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
2.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	18
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	18
3	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
3.1	<b>Produção agrícola no Brasil</b> .....	19
3.2	<b>Controle Biológico contra fitopatógenos ou doenças de plantas</b> .....	19
3.3	<b>Lipopeptídeos</b> .....	20
3.3.1	<i>Aplicações agrícolas, clínicas e comerciais dos lipopeptídeos</i> .....	24
3.3.2	<i>Lipopeptídeos no controle de fitopatógenos</i> .....	26
3.4	<b>Produção dos lipopeptídeos</b> .....	29
3.5	<b>Métodos analíticos para análise química de lipopeptídeos</b> .....	32
3.5.1	<i>Validação de métodos analíticos de quantificação</i> .....	32
3.6	<b>Processo de Downstream de lipopeptídeos</b> .....	36
3.6.1	<i>Técnicas de purificação das famílias de lipopeptídeos</i> .....	37
4	<b>Etapas da Tese</b> .....	41
4.1	<b>Quantificação simultânea de isoformas de lipopeptídeos por UPLC-MS em caldo fermentado por <i>Bacillus subtilis</i> CNPMS 22</b> .....	43
4.2	<b>Ampliação de escala no fracionamento de famílias de lipopeptídeos por cromatografia líquida associada a partição líquido-líquido</b> .....	60
4.3	<b>Potencial antifúngico de famílias de lipopeptídeos produzidos pelo <i>B. Subtilis</i> CNPMS 22</b> .....	82
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	98
6	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	99
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	100

## 1 INTRODUÇÃO

A aplicação exagerada de produtos químicos nas lavouras está deixando de ser uma questão relacionada especificamente à produção agrícola e está se transformando em um problema de saúde pública e da preservação da natureza. Assim, a busca por alternativas para o controle de fitopatógenos e doenças em plantas cresce substancialmente no mundo. Os produtos naturais são uma importante fonte alternativa para a produção de antifúngicos naturais, pois são substâncias que não se acumulam no ambiente, se degradam rapidamente, diminuem as chances de os patógenos criarem resistências e são em geral mais seguros para o meio ambiente e para saúde humana. Os metabólitos produzidos por microrganismos representam uma importante fonte e pouco explorada na busca de compostos naturais com potencial para o controle de fitopatógenos. Uma das bactérias mais amplamente utilizadas no controle de fitopatógenos é o *Bacillus subtilis*, pois possui a capacidade de produzir uma grande variedade de famílias de lipopeptídeos com atividade antifúngica (CHINTKUNTLA, 2015; FIGUEIREDO et al., 2010; MEENA; KANWAR, 2015).

Os lipopeptídeos apresentam várias aplicações como, por exemplo, a iturina possui forte eficácia contra vários fungos fitopatogênicos. Possui ação antibiótica, baixa toxicidade e baixo efeito alérgico em humanos e animais (PIEDRAHÍTA-AGUIRRE; ALEGRE, 2014; WANG et al., 2015; YÁNEZ-MENDIZÁBAL et al., 2012a). A fengicina atua no controle de doenças em plantas, exibindo ação antifúngica, especificamente contra fungos filamentosos (RANGARAJAN; DHANARAJAN; SEN, 2015). Já a surfactina é a principal representante da família dos lipopeptídeos, apresentando ação antibiótica, antitumoral, antiviral e inibidora de toxinas (MEENA; KANWAR, 2015).

Até o ano de 2016, existiam 137 produtos de controladores biológicos registrados pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), entretanto este número é inferior quando comparado a quantidade e variedade de defensivos químicos, que é de 614 (PEREIRA DIAS, 2016). A pouca representatividade dos produtos naturais no mercado agrícola deve-se principalmente ao custo elevado do produto, conseqüentemente os agricultores optam pelos agrotóxicos. Esse alto preço das biomoléculas é um resultado da baixa produtividade dos compostos, juntamente com as despesas da etapa de purificação da molécula alvo, que correspondem cerca de 50 a 90% dos custos de

produção. A redução do número de operações unitárias envolvidas no processamento bem como, dos insumos utilizados pode reduzir os custos de fabricação e conseqüentemente tornar o produto mais competitivo no mercado (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Uma alternativa para impulsionar a comercialização dos inseticidas biológicos, de um modo geral, é aumentar a produtividade das moléculas produzidas, aprimorando o processo fermentativo. Sabe-se que as condições operacionais como pH, temperatura, tempo e teor de oxigênio dissolvido, além da formulação do meio de cultivo, têm um efeito relevante no crescimento, esporulação e produção das biomoléculas. É sabido que as condições se diferenciam de acordo com a linhagem e, por isso, cada parâmetro fermentativo deve ser estudado a fim de garantir a presença das biomoléculas fungicidas no caldo fermentado, bem como de sua concentração. Entretanto, é necessário estabelecer métodos de monitoramento dessa produção, visando verificar quais fatores estão influenciando no processo. Atualmente, existem alguns métodos para quantificar lipopeptídeos incluindo cromatografia líquida de alta performance com detectores UV-vis e UPLC-MS. (BINIARZ; ŁUKASZEWICZ, 2017; GEISLER et al., 2017; MENG et al., 2015b; YUAN et al., 2011).

No entanto, esses métodos quantificam apenas uma família específica de cada vez, ou a mistura de uma única isoforma de cada família, esquecendo que em amostras biológicas podem apresentar vários tipos de isoformas e séries homólogas ao mesmo tempo. Uma técnica atraente para a quantificação dessas isoformas e séries homólogas de lipopeptídeos é o uso de cromatografia líquida de alto desempenho com detector quadrupolo com monitoramento de íon (UPLC-QDA-SIM), uma vez que é uma técnica que facilita o monitoramento simultâneo de todos os produtos químicos de interesse em uma única corrida cromatográfica. Portanto, o desenvolvimento de um método analítico capaz de quantificar a produção de famílias de lipopeptídeos, bem como suas isoformas e séries homólogas é de suma importância, uma vez que, será possível monitorar os parâmetros fermentativos que favorecem ou diminuem a produção, podendo assim direcionar o processo fermentativo para produzir uma maior quantidade de uma determinada família de lipopeptídeo ou até mesmo uma isoforma, ou séries homólogas que apresente uma maior atividade antifúngica, tornando-se assim, uma ferramenta industrial útil na produção desses compostos.

Além do aperfeiçoamento do processo fermentativo, a etapa de purificação deve ser examinada, a fim de diminuir os custos de obtenção dessas biomoléculas. É sabido que a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa já é uma técnica



consolidada no fracionamento de famílias de lipopeptídeos, entretanto, ainda apresenta desvantagem como o uso de grande volume de solvente, além dos problemas cromatográficos comuns. Dessa maneira, a utilização de técnicas convencionais associadas como, por exemplo, a partição líquido-líquido com a cromatografia líquida é uma alternativa para tentar alavancar a etapa de purificação destes compostos (YANG et al., 2015).

Outro passo importante é a verificação do potencial fungicida desses lipopeptídeos contra patógenos, especialmente aqueles que causam perdas de produtividade nas culturas de banana, melão e caju, especificamente contra cepas de *Colletotrichum musae* (agente da antracnose), *Fusarium pallidoroseum* (agente de podridão pós-colheita) e *Lasiodiplodia caatingensis* (agente de resinose). Essas culturas tem uma grande importância econômica para a região do Nordeste brasileiro, e assim a utilização de fungicidas alternativos trazem a possibilidade de oferecer à população alimentos saudáveis e livres de defensivos químicos, o que será benéfico para a população e o meio ambiente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Diante do exposto, o objetivo geral do presente trabalho foi quantificar, purificar e verificar a ação fungicida dos lipopeptídeos produzidas pelo *B. subtilis* CNPMS 22.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método de quantificação dos lipopeptídeos;
- Ampliar a escala de fracionamento das famílias de lipopeptídeos utilizando HPLC em escala semi-preparativa e preparativa;
- Isolar as famílias de lipopeptídeos por partição líquido-líquido;
- Verificar a viabilidade de associação da cromatografia líquida com a partição líquido-líquido;
- Avaliar a atividade fungicida das famílias de lipopeptídeos isoladas frente a fitopatógenos causadores de doenças no cajueiro e meloeiro.
- Avaliar a citotoxicidade das famílias de lipopeptídeos isoladas.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Produção agrícola no Brasil**

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, sua produção foi estimada em 41,5 milhões de toneladas (SEBRAE 2016). Em especial, as culturas de banana, melão e caju que se destacam dentro do agronegócio brasileiro. Segundo a FAO (2019), foram produzidos no Brasil cerca de 6,6 milhões de toneladas de banana, 540 milhões de toneladas de melão e 1 milhão de toneladas de caju em 2017. Essas cultivares são de extrema importância econômica para a região do Nordeste brasileiro. Apesar da ampla produção agrícola, existem quedas acentuadas de produtividade devido ao ataque de fungos nas lavouras, que atingem as raízes, colmos, folhas e espigas, além de fungos de armazenamento e produtores de micotoxinas (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006).

Durante muitos anos, os agrotóxicos têm sido utilizados em grande escala como meio profilático no controle de doenças em plantações. Embora o emprego dessas substâncias tenha contribuído para o crescimento da produção agrícola, este também trouxe muitos malefícios, devido à aplicação indiscriminada e o uso incorreto dos agrotóxicos, que ocasionam a contaminação do solo, contaminação da água, aparecimento de patógenos resistentes, intoxicação de produtores rurais, acúmulo de substâncias tóxicas em alimentos, dando origem a uma série de preocupações sobre a saúde pública e a poluição ambiental (ACCINELLI et al., 2014; BRAVO et al., 2011; CHINTKUNTALA, 2015). Novas abordagens surgiram ao longo do tempo como alternativas para o controle de doenças. Dentre os vários métodos de produção, as substâncias produzidas por microrganismos mostra-se um substituto promissor para os agrotóxicos (ACCINELLI et al., 2014; CAWOY et al., 2015).

#### **3.2 Controle Biológico contra fitopatógenos ou doenças de plantas**

O controle biológico é definido como sendo a liberação de agentes naturais especializados no ecossistema com o objetivo de reduzir permanentemente uma espécie-alvo em número e diminuir os impactos causados por elas. Tal sistema de controle apresenta um perfil ambiental eficiente no controle de fitopatógenos, mais favorável e seguro para a população (GOLDSON et al., 2014).

Dentre os microrganismos mais utilizados no biocontrole, as bactérias destacam-se como promissoras no controle biológico. Muitos gêneros de *Bacillus* são conhecidos por serem microrganismos antagonistas devido ao seu potencial de produzirem compostos antimicrobianos que atuam contra o crescimento de patógenos em plantas (CAO et al., 2012; CAWOY et al., 2015; LIU et al., 2014; MEENA; KANWAR, 2015; ONGENA; JACQUES, 2008; PATHAK et al., 2012; WAEWTHONGRAK; LEELASUPHAKUL; MCCOLLUM, 2014).

Estudos *in vitro* demonstraram a atividade antagonista da bactéria endofítica do *Bacillus subtilis* CNPMS 22, contra fungos causadores de doenças em milho e sorgo: *Acremonium striticum*, *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus spp*, *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* e *Colletotrichum sublineolum*. Também foi relatada sua eficiência no controle de fungos patogênicos em sementes de milho durante o período de germinação, principalmente sobre *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* (FIGUEIREDO, J. E. F.; TEIXEIRA, M. A.; LIMA, G. V. C.; QUINTAO, P. L.; CORREA; A.; BRESSAN W.; PINTO, N. F. J.; CASELA, 2010; FIGUEIREDO et al., 2010; TEIXEIRA; BRESSAN; CASELA, 2006). A espécie *B. subtilis* se destaca como sendo uma das bactérias mais amplamente utilizadas no controle de fitopatógenos, devido ao seu potencial em produzir uma grande variedade de lipopeptídeos com atividade antifúngica (CAWOY et al., 2015; LIU et al., 2015; MEENA; KANWAR, 2015; ONGENA; JACQUES, 2008; PATHAK et al., 2012; WAEWTHONGRAK; LEELASUPHAKUL; MCCOLLUM, 2014).

### 3.3 Lipopeptídeos

Os lipopeptídeos são um grupo de biosurfactantes que possuem em sua estrutura básica uma cadeia de peptídeos ligados a ácidos graxos. Os lipopeptídeos são divididos em famílias e as principais são: iturina, fengicina e surfactina (DHANARAJAN; RANGARAJAN; SEN, 2015; JACQUES, 2011). As famílias dos lipopeptídeos são substâncias cíclicas de sete ou dez  $\alpha$ -aminoácidos ligados a um único ácido graxo  $\beta$ -amino (iturinas) ou  $\beta$ -hidroxi (surfactinas e fengicinas). 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>, no caso de fengicinas e de C<sub>13</sub> a C<sub>16</sub> para surfactinas (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010). A variação do número de átomos de carbono na composição dos aminoácidos da parte peptídica subdivide os lipopeptídeos em isoformas. As isoformas podem ainda ser

subdividas em séries homólogas, que variam no número de átomos de carbono que compõem a cadeia lipídica (Tabela 1 e Figura 1) (JACQUES, 2011).

**Tabela 1** - Sequência de peptídeos e cadeia de ácidos graxos das diferentes variantes de cada família de lipopeptídeos de *Bacillus spp.*

NOME	ESTRUTURA PRIMÁRIA DA PORÇÃO PEPTÍDICA	CADEIA DE ÁCIDO GRAXO
<b>FAMÍLIA DAS FENGICINAS</b>	Decapeptídeo com um anel lactona entre o grupo carboxi terminal da Ile10 e o grupo OH da Tyr3	$\beta$ -OH ácidos graxos
Fengicina A	<i>L</i> -Glu-D-Orn-D-Tyr-D-a Thr-L-Glu- <b>D-Ala</b> -L-Pro-L-Gln- <b>L-Tyr</b> -L-Ile	<i>aC15, iC16, nC16</i>
Fengicina B	<i>L</i> -Glu-D-Orn-D-Tyr-D-a Thr-L-Glu- <b>D-Val</b> -L-Pro-L-Gln- <b>L-Tyr</b> -L-Ile	<i>aC15, iC16, nC16, C17</i>
PlipastatinaA	<i>L</i> -Glu-D-Orn-L-Tyr-D-a Thr-L-Glu- <b>D-Ala</b> -L-Pro-L-Glu- <b>D-Tyr</b> -L-Ile	<i>nC16, aC17</i>
Plipastatina B	<i>L</i> -Glu-D-Orn-L-Tyr-D-a Thr-L-Glu- <b>D-Val</b> -L-Pro-L-Glu- <b>D-Tyr</b> -L-Ile	<i>nC16, aC17</i>
<b>FAMÍLIA DAS ITURINAS</b>	Heptapeptídeo fechado em um anel lactona com um grupo $\beta$ -NH <sub>2</sub> da cadeia ácida	$\beta$ -NH <sub>2</sub> ácidos graxos
Bacillicomicina D	<i>L</i> -Asn-D-Tyr-D-Asn- <b>L-Pro-L-Glu-D-Ser-L-Thr</b>	<i>nC14, iC15, aC15</i>
Bacillicomicina F	<i>L</i> -Asn-D-Tyr-D-Asn- <b>L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Thr</b>	<i>nC16, iC17, aC17</i>
Bacillicomicina L ou Lca	<i>L</i> -Asn-D-Tyr-D-Asn- <b>L-Ser-L-Glu-D-Ser-L-Thr</b>	<i>nC14, iC15, aC15</i>
Iturina A	<i>L</i> -Asn-D-Tyr-D-Asn- <b>L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser</b>	<i>nC14, iC15, aC15</i>
Iturina AL	<i>L</i> -Asn-D-Tyr-D-Asn- <b>L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser</b>	<i>nC16, aC16</i>
Iturina C	<i>L</i> -Asn-D-Tyr-D-Asn- <b>L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser</b>	<i>nC14, iC15, aC15</i>
Micosubtilisina	<i>L</i> -Asn-D-Tyr-D-Asn- <b>L-Gln-L-Pro-D-Ser-L-Asn</b>	<i>nC16, iC16, aC17</i>
<b>FAMÍLIA DAS SURFACTINAS</b>	Heptapeptídeo fechado em um anel lactona com o grupo $\beta$ -OH da cadeia de ácido graxo	$\beta$ -OH ácidos graxos
Bamilocina Ac	<b>Glu-Leu-Met-Leu-Pro-Leu-Leu-Leu</b>	C13
Esperinad	<b>L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-XE7-COOH</b>	C13, C14, C15
Lichenisinae	<b>L-XL1-L-XL2-D-Leu-L-XL4-L-Asp-D-Leu-L-XL7</b>	<i>iC13, aC13, nC14, iC15, aC15</i>
Pumilacidina	<b>L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp-D-Leu-L-XP7</b>	<i>aC15, iC15, nC16, iC16, aC17, iC17</i>
Surfactina	<b>L-Glu-L-XS2-D-Leu-L-XS4-L-Asp-D-Leu-L-XS7</b>	<i>iC14, nC14, iC15, aC15</i>

<sup>a</sup> ou bacilopeptina

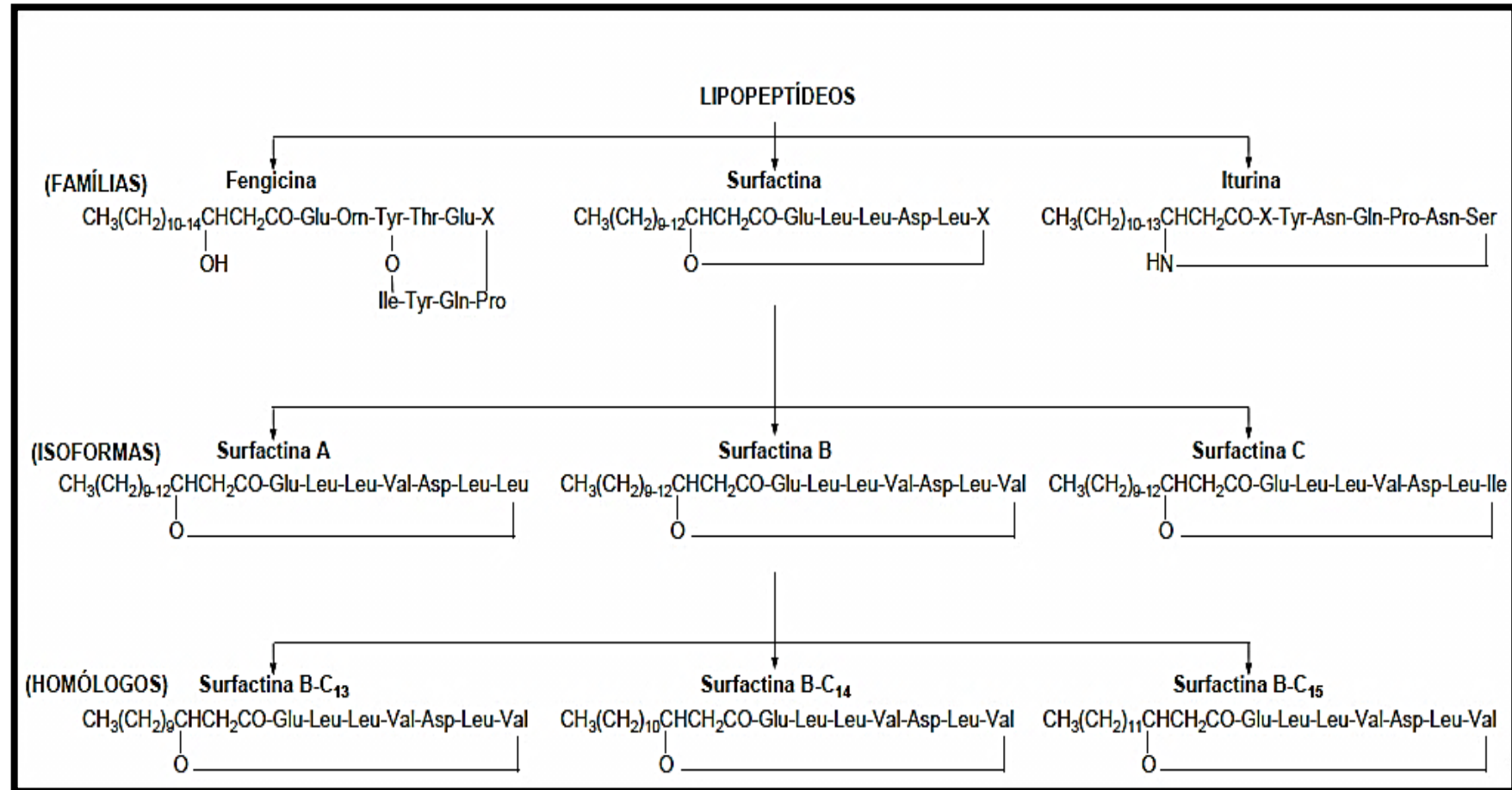
<sup>b</sup> as formas D dos resíduos de aminoácidos são deduzidas pela estrutura modular de peptídeo sintases não ribossomais

<sup>c</sup> as formas D e L não são especificadas

<sup>d</sup> a  $\beta$ -carboxila do Asp<sub>5</sub> faz parte da composição da lactona <sup>e</sup> ou halobacilina. Com XE<sub>7</sub> = Leu ou Val, XL<sub>1</sub> = Gln ou Glu, XL<sub>2</sub> = Leu ou Ile XL<sub>4</sub> e XL<sub>7</sub> = Val ou Ile, XP<sub>7</sub> = Val ou Ile, XS<sub>2</sub> = Val, Leu ou Ile, XS<sub>4</sub> = Ala, Val, Leu ou Ile, XS<sub>7</sub> = Val, Leu ou Ile

**FONTE:** (JACQUES, 2011)

Figura 1 - Subdivisões dos lipopeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis*.

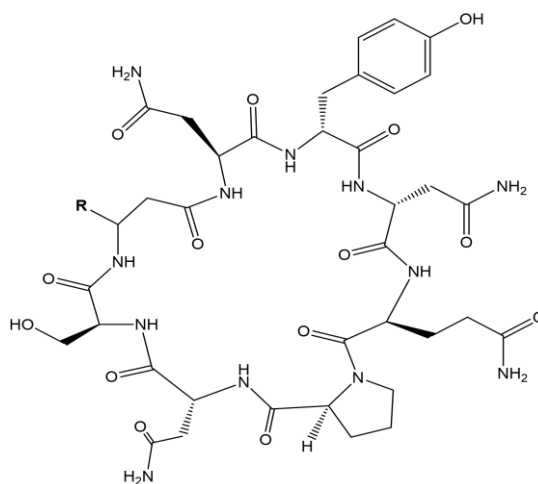


Fonte: (SLIVINSKI, 2012)

### 3.3.1 Aplicações agrícolas, clínicas e comerciais dos lipopeptídeos

Os lipopeptídeos apresentam várias aplicações como, por exemplo, a iturina (Figura 2) possui forte eficácia contra vários fungos fitopatogênicos comparáveis a fungicidas disponíveis comercialmente. Possui ação antibiótica, baixa toxicidade e baixo efeito alérgico em humanos e animais (PIEDRAHÍTA-AGUIRRE; ALEGRE, 2014; WANG et al., 2015; YÁNEZ-MENDIZÁBAL et al., 2012a). DEY et al., (2015), em seus experimentos, verificou um potencial de atividade citotóxica contra o câncer de mama da iturina A. Já KAWAGOE et al., 2015, relatou que a iturina A ativa o sistema de defesa da planta contra patógenos, exercendo um papel na supressão de doenças de plantas, atuando como uma molécula bifuncional através de sua atividade antifúngica e ativação de sistemas de defesa de plantas.

Figura 2 - Estrutura molecular da iturina A.



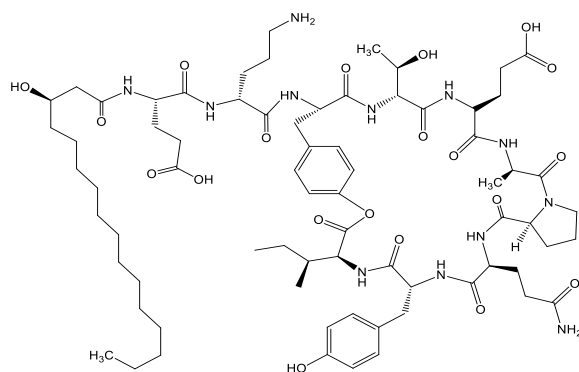
Fonte: Autor, 2019.

A fengicina (Figura 3) atua no controle de doenças em plantas, possui ação antifúngica, inibindo especificamente fungos filamentosos, apresentando uma maior eficiência no combate desses quando comparado com a substância iturina, e apresenta também atividade antibacteriana (GUO et al., 2014; YÁNEZ-MENDIZÁBAL et al., 2012b). É um excelente candidato para tratar topicamente dermatomicoses (infecções fúngicas cutâneas comuns causadas por fungos filamentosos) (EEMAN et al., 2014). Também apresenta atividade hemolítica mais baixa do que outros agentes, tornando-se



um forte candidato como um novo medicamento para o tratamento de infecções fúngicas (HORN; CRAVENS; GROSSFIELD, 2013).

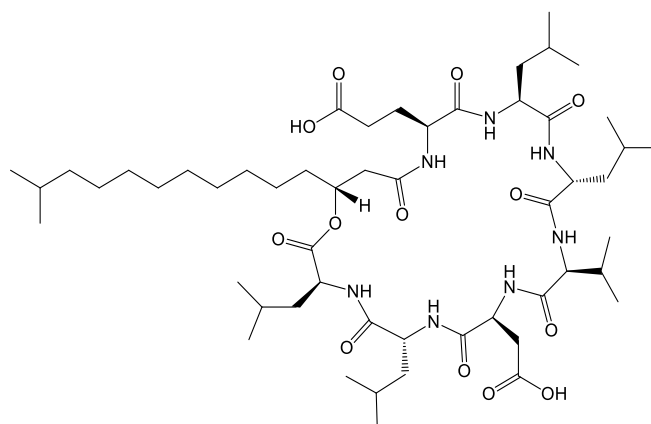
Figura 3- Estrutura molecular da fengicina.



Fonte: Autor, 2019.

A surfactina (Figura 4) é a principal representante da família dos lipopeptídeos, possui ação antibiótica, antitumoral, anti-inflamatória, atua como agente antiviral, como inibidora de toxinas e pode inibir a inflamação crônica nas lesões ateroscleróticas. Também possui potencial terapêutico para melhorar a doença de Alzheimer, bem como outras doenças neurodegenerativas. Estas características fazem da surfactina uma substância potente para solucionar questões apresentadas na medicina, nas indústrias de alimentos e também na diminuição do uso de agrotóxico na agricultura (GAN et al., 2016; MEENA; KANWAR, 2015; PARK et al., 2013; SILVA et al., 2015; WANG et al., 2010; ZHANG et al., 2014).

Figura 4- Estrutura molecular da surfactina.



Fonte: Autor, 2019.

### 3.3.2 *Lipopeptídeos no controle de fitopatógenos*

Algumas pesquisas já abordam o potencial das famílias de lipopeptídeos contra alguns fungos e bactérias causadoras de doenças em plantas, como por exemplo, na pesquisa de ARROYAVE-TORO; MOSQUERA; VILLEGAS-ESCOBAR, (2017), na qual estudaram a atividade antifúngica dos lipopeptídeos (iturina A e fengicina C) produzidos pelo *B. subtilis* EA-CB0015 contra o *Colletrotrichum acutatum*, que é o vetor da antracnose, uma doença que ataca as folhas, causando desfolha precoce, debilitando a planta e ocasionando exposição excessiva dos frutos ao sol, causando queimaduras nos mesmos e afetando a produção e a qualidade dos frutos (VIANA et al., 2001). Os pesquisadores verificaram em experimentos *in vitro* que a família de iturina teve uma ação fungicida significativa contra o *Colletrotrichum acutatum*, na qual necessitou de apenas uma concentração de 32 ppm para ocasionar 1% na inibição do crescimento fúngico, já a fengicina necessitou de uma concentração maior quando comparada a da iturina, cerca de 128 ppm. E em experimentos *in vivo* os sintomas de antracnose causados por *Colletrotrichum acutatum* nos frutos de tamarillo foram completamente eliminados quando tratados somente com as células de *B. subtilis* EA-CB0015, tendo os sintomas reduzidos em 76%. Neste mesmo estudo, os pesquisadores verificaram a atividade antifúngica dos lipopeptídeos contra o *Botrytis cinerea* responsável pelo “mofo cinzento”, considerada uma patologia pós-colheita, em que ocorreu uma inibição de 72% do mofo cinzento quando as flores de crisântemo foram tratadas com os lipopeptídeos e uma redução de 39% quando aplicado as células do *B. subtilis* EA-CB0015. Estes dois fitopatógenos analisados foram considerados com um dos 10 fungos patogênicos mais devastadores, pois possuem uma ampla gama de hospedeiros, assim ficou evidenciado o grande espectro de ação antifúngico que as famílias de lipopeptídeos possuem e o seu poder em controlar doenças pós-colheita.

Os lipopeptídeos produzidos pelos *Bacillus* CtpxS2-1 e CtpxS3-5 foram testados contra o *C. acutatum* presentes em sementes de *Lupinus mutabilis*, popularmente conhecido como tremoço branco, que é uma leguminosa nativa dos povos indígenas da América do Sul e é considerada uma fonte de proteína com baixo teor de gordura nos alimentos. Os autores verificaram uma forte atividade fungicida contra o agente da antracnose reduzindo a incidência da doença em 94% (YÁNEZ-MENDIZÁBAL; FALCONÍ, 2018).

A surfactina produzida pelo *B. subtilis* KLP2015 foi avaliada contra *Mucor* sp. e *Aspergillus niger*, que são fungos que ocasionam doenças em plantas e especificamente o *Aspergillus niger* é o vetor da doença chamada “bolor negro” que atinge certos tipos de frutas e legumes, como também em alimentos armazenados. Neste estudo a surfactina foi capaz de inibir o crescimento de *Mucor* sp. em 75,1% e em 41,9% para o *Aspergillus niger*. Com relação ao estudo da concentração inibitória mínima (CIM), a surfactina foi mais efetiva contra o crescimento de *Mucor* sp., apresentando uma CIM de 6,25 mg.mL<sup>-1</sup>, enquanto que para o *Aspergillus niger* foi de 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> (MEENA et al., 2018).

O potencial dos lipopeptídeos produzidos pelo *Bacillus* sp. EA-CB0959 foi avaliado frente a *Ralstonia solanacearum* que é vetor da doença Moko da bananeira, neste estudo verificou-se uma maior bioatividade contra o *Ralstonia solanacearum* quando se utilizou a fengicina, na qual apresentou uma CIM de 32 µg / mL. A fengicina foi capaz também de reduzir a proliferação da doença do Moko na bananeira em 35%. Através deste estudo nota-se evidências da atividade antibacteriana *in vitro* das fengicinas contra o Moko da bananeira (VILLEGAS-ESCOBAR et al., 2018).

Um dos principais agentes causadores da podridão pós-colheita é o fungo da espécie *Fusarium*, ele age secretando suas micotoxinas sobre os frutos, ocasionando a morte dos seus tecidos e conseqüentemente perda da sua qualidade, bem como do seu valor nutricional. Essas micotoxinas tem sido relatadas como causadoras de mutagêneses e carcinogênese em células humanas (TERAO et al., 2008).

O potencial da surfactina produzida pelos *Bacillus* NH-100 e NH-217 foram avaliados contra o *Fusarium moniliforme* e observou-se que a surfactina A exibiu uma notável atividade antagônica contra a doença de Bakanae que atinge plantações de arroz, sugerindo que a surfactina A purificada pode ser um agente de biocontrole podendo ser incorporado, com uma estratégia para o manejo da doença (SARWAR et al., 2018).

Os lipopeptídeos produzidos pelo *Bacillus subtilis* SPB1 foram testados contra o *Fusarium solani* e o ensaio *in vitro* revelou uma concentração inibitória mínima de cerca de 3 mg mL<sup>-1</sup> com um modo de ação fungicida (MNIF et al., 2015).

Outra doença importante é a resinose, que tem como vetor o fungo da espécie *Lasiodiplodia*, que provoca diferentes sintomas na planta, como por exemplo, seca-descendente, cancro em ramos, caules e raízes, lesões em estacas, folhas, frutos e sementes, ocasionando também o início da morte de mudas e enxertos. Esse patógeno é

altamente eficiente em disseminar seus esporos no meio ambiente, provocando contaminação e doenças desde o plantio até a pós-colheita dos frutos (OLIVEIRA et al., 2009).

A fengicina, surfactina e bacilomicina produzida pela cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* CGMCC 5569 mostraram uma forte atividade de inibição do crescimento *in vitro* contra os fungos *L. rubropurpurea*, *L. crassispora* e *L. theobromae*, em cerca de 70,22%, 69,53% e 78,76%, respectivamente. Este resultado indica que os metabólitos secundários produzidos pelo *Bacillus amyloliquefaciens* CGMCC 5569 podem fornecer um recurso alternativo para o biocontrole (YUAN et al., 2012).

Nestes trabalhos citados diferentes metodologias foram utilizadas para avaliar a bioatividade dos lipopeptídeos, sendo as mais comuns: método de difusão em ágar por poço, difusão em disco e com o próprio meio de cultura dopado com a substância fungicida a ser avaliada (ARROYAVE-TORO; MOSQUERA; VILLEGAS-ESCOBAR, 2017; BONA et al., 2014; CHEN et al., 2017; MNIF et al., 2015; YE et al., 2012).

Estes métodos são igualmente aceitáveis para medir o halo de inibição fúngico que representa quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra uma cepa específica. Através dessas metodologias também se realiza a determinação da CIM, que nada mais é que a concentração mínima capaz de inibir 1% do crescimento fúngico, normalmente realizam-se diluições em série do composto e faz-se as medições do halo e posteriormente os dados são tratados estatisticamente e assim é determinado a concentração mínima inibitória da substância (ARROYAVE-TORO; MOSQUERA; VILLEGAS-ESCOBAR, 2017).

Diante do exposto, nota-se que as famílias de lipopeptídeos possuem um grande potencial para o biocontrole de fungos e bactérias tanto nas lavouras como em pós colheita, além de não apresentarem toxicidade para células humanas, o que é vantajoso, pois não ocasionará danos à saúde humana. Portanto, as famílias de lipopeptídeos são uma excelente alternativa para a substituição dos defensivos químicos, dando a possibilidade de oferecer a população alimentos livres de agrotóxicos (BARROS et al., 2007; MANDAL; BARBOSA; FRANCO, 2013; SILVA et al., 2015). Como foi explanado, os lipopeptídeos são compostos interessantes para a prospecção industrial, entretanto, a principal barreira na aplicação em grande escala destas substâncias é o elevado custo de produção, que é resultado da baixa produtividade juntamente com o alto custo na recuperação e purificação dos compostos do caldo fermentado (WANG et al., 2010; ZOUARI; ELLOUZE-CHAABOUNI; GHRIBI-AYDI, 2014).

### **3.4 Produção dos Lipopeptídeos**

O que pode impulsionar a comercialização dos lipopeptídeos, de um modo geral, é aumentar a produção das biomoléculas à baixo custo. Analisando a cadeia produtiva destes compostos têm-se que a fermentação é uma etapa crucial, pois sabe-se que os parâmetros fermentativos como, por exemplo, natureza da fonte de carbono e de nitrogênio; condições ambientais como pH, temperatura, agitação e oxigenação; e concentração de nutrientes como P, Fe, S, Mg e Mn influenciam significativamente na síntese dos lipopeptídeos, refletindo no tipo e na quantidade de cada família, isoforma e série homóloga produzida (CHEN; JUANG; WEI, 2015; DE OLIVEIRA, 2006; INÈS; DHOUBA, 2015; RANGARAJAN; DHANARAJAN; SEN, 2015; VALPUESTA, 2008b). Nas tabelas 2 e 3 estão os parâmetros mais estudados em pesquisas sobre produção de lipopeptídeos.

Tabela 2- Condições fermentativas para a produção de iturina e fengicina.

Família	Microrganismo	Fonte de carbono, nitrogênio e sais minerais	Oxigênio	Rotação (rpm)	Tempo (h)	pH	T °C	Produção	Referência
Iturina	<i>B. subtilis</i>	Farelo de soja	-	-	24	7-8	39-42	1,200±566 AU/mL*	(LEÃES et al., 2011)
		Meio BHI broth	-	125	36	6	37	800 AU/mL*	(LEÃES et al., 2013)
		0,93% de maltodextrina, 1,11% de glucose, 0,72% de pó de milho MgSO <sub>4</sub> 1,5 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,75 mM	2 vvm**	180	144	6	30	175,52 mg.L <sup>-1</sup>	(SHIH et al., 2009)
Fengicina	<i>Bacillus megaterium</i>	Glicose - 30 g L <sup>-1</sup> , NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -6 g L <sup>-1</sup> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 0,028 g L <sup>-1</sup> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 1,6 g L <sup>-1</sup> , MgSO <sub>4</sub> - 0,3 g L <sup>-1</sup> E CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O - 0,2 g L <sup>-1</sup> . Fe <sup>2+</sup> foi adicionado intermitentemente para todas as experiências	0,34 v/v ***	121	32	-	33°C	3,50 g.L <sup>-1</sup>	(RANGARAJAN; DHANARAJAN; SEN, 2015)

\*Atividade antimicrobiana

\*\*vvm: Taxa de aeração

\*\*\*v/v: volume relativo de enchimento

Fonte: Autor, 2019.

Tabela 3- Condições fermentativas para a produção de surfactina.

Microorganismo	Fonte de carbono, nitrogênio e sais minerais	Oxigênio	rpm	Tempo	pH	T (°C)	Produção	Referência
<i>B. subtilis</i>	4 mM Fe <sup>2+</sup> ; 1 mM ZnSO <sub>4</sub> , e 0,1 mM 1mMFeC <sub>13</sub> MnSO <sub>4</sub>	-	150	-	6,5 e 6,8	37	-	(ABDEL-MAWGOUD; HASSOUNA, 2008)
<i>B. subtilis</i>	Solução contendo carbono e Nitrogênio: 40 g/L glucose, 50 mmol/L NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , 30 mmol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 30 mmol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 7 mmol/L CaCl <sub>2</sub> e 4 mmol/L (Na-EDTA)  Solução contendo sais minerais: 0.8 mmol/L MgSO <sub>4</sub> , 4 mmol/L FeSO <sub>4</sub> . 0.1 mmol/L de MnSO <sub>4</sub> , 0,1 mM do íon metálico Mn <sup>2+</sup> / nitrato de amônia	-	200	-		30	1,5 g.L <sup>-1</sup>	(HUANG et al., 2015)
<i>B. subtilis</i>	Glicose e 0,1% de solução de micronutrientes	1 L.min <sup>-1</sup>	200	24 h		30	115 mg.L <sup>-1</sup>	(DEBON, 2015)
<i>B. subtilis</i>	2 mM de FeSO <sub>4</sub> / 0,2 mM de MnSO <sub>4</sub> / 0,8 mM de MgSO <sub>4</sub>		200	-		30	1,5 g.L <sup>-1</sup>	(HUANG et al., 2015)

Fonte: Autor, 2019.

### 3.5 Métodos analíticos para análise química de lipopeptídeos

Juntamente com o processo fermentativo faz-se necessário o desenvolvimento de um método analítico capaz de quantificar os lipopeptídeos produzidos, uma vez que se torna possível monitorar quais parâmetros fermentativos proporcionam um aumento ou decréscimo da produção, bem como no monitoramento da produção em larga escala. Atualmente, existem alguns métodos na literatura para quantificar lipopeptídeos incluindo cromatografia líquida de alta performance com detectores UV-Vis e sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS) (BINIARZ; ŁUKASZEWICZ, 2017; GEISLER et al., 2017; MENG et al., 2015a; YUAN et al., 2011). No entanto, esses métodos quantificam apenas uma família específica por vez, ou a mistura de uma única isoforma de cada família. Sabe-se que em um processo fermentativo ocorre a produção de várias famílias e consequentemente a produção de isoformas e séries homólogas simultaneamente. Uma técnica que é atraente para a quantificação dessas isoformas e séries homólogas de lipopeptídeos é o uso de cromatografia líquida acoplada a detecção de massas no modo SIM (single ion monitoring), pois facilita o monitoramento simultâneo de todos os produtos químicos de interesse em uma única corrida cromatográfica, devido a detecção da  $m/z$  do composto, juntamente com a especificação do respectivo tempo de retenção, minimizando o risco de coeluição ou presença de componentes que não sejam de interesse.

#### 3.5.1 Validação de métodos analíticos de quantificação

Para propor um novo método de quantificação dos lipopeptídeos é necessário inicialmente realizar o processo de validação do método analítico pré-estabelecido. A validação é uma etapa fundamental, pois consiste em garantir a veracidade da quantificação ou a precisão do método e avalia os riscos que podem ser expressos pela medida de incertezas associadas a quantificação. Contudo, requisitos para a validação são normatizados por agências regulamentadoras, como por exemplo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o International Conference on Harmonization (ICH). Esses guias de validação estabelecem parâmetros e critérios de aceitação aplicáveis à validação e visam garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade. Para a validação do método analítico é necessário avaliar alguns parâmetros como: a



seletividade, linearidade das curvas, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão e exatidão. Com a avaliação desses termos é possível verificar o desempenho analítico do método proposto (BARBOSA et al., 2017; GUEDES, 2015; ICH, 2014; MAPA, 2011; MARTINS, F. I. C. C.; BARBOSA, P. G. A ; ZOCCOLO; NASCIMENTO, 2018; RIBANI et al., 2004).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento da validação de um método analítico, que verifica de forma inequívoca, a capacidade do procedimento analítico em distinguir entre o composto de interesse e substâncias análogas que podem interferir na sua determinação em amostras complexas (MAPA, 2011; RIBANI et al., 2004). Segundo RIBANI et al., (2004), existem várias maneiras de avaliar a seletividade, as duas mais utilizadas são comparar a matriz de interesse contendo o composto (padrão), com um branco (matriz isenta da substância de estudo), sendo que nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do composto analisado, distinguindo-se das demais substâncias da amostra. A outra maneira é a comparação do espectro do pico obtido com a de um padrão e utilizar isso como um indicativo da presença da substância pura.

A linearidade é a aptidão do método em reproduzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito presentes na amostra, dentro de uma faixa de concentração especificada. Para isso, uma curva de calibração é feita com a finalidade de traçar a correlação entre a resposta instrumental e a concentração conhecida do analito. A avaliação da curva de calibração é realizada através do método matemático conhecido como regressão linear, verificando os coeficientes de regressão **a** e **b** e observando o coeficiente de correlação **r**. O ICH estabelece que um coeficiente de correlação maior que 0,99 indica um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão, indicando menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados. As diretrizes do MAPA e do ICH estabelecem que as curvas devem ser elaboradas com no mínimo cinco níveis de concentração (BARBOSA et al., 2017; FABRE, 1999; GUEDES, 2015; ICH, 2014; MAPA, 2011; MARTINS, F. I. C. C.; BARBOSA, P. G. A ; ZOCCOLO; NASCIMENTO, 2018; RIBANI et al., 2004).

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração, em que o analito pode ser detectado, mas não obrigatoriamente precisa realizar sua quantificação. O LOD pode ser estimado através de três métodos diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica. O método visual consiste em verificar o analito em concentração conhecida, de tal maneira que seja possível distinguir a relação sinal e ruído analítico pela visualização da menor concentração visível. Já o

método relação sinal-ruído só é aplicado quando existem ruídos na linha de base. A estimativa é feita baseado na medição dos sinais da amostra em baixas concentrações conhecidas e um branco isento dos compostos de interesse. Dessa forma é definido uma concentração mínima em que o composto pode ser detectado. Normalmente, a relação sinal-ruído de 3:1 ou 2:1 são proporções aceitáveis na avaliação do LOD. Por fim, o método baseado em parâmetros da curva analítica, na qual utiliza-se a Equação 1 para estimar LOD, onde  $S_b$  é o desvio padrão no intercepto em Y e  $a$  é o coeficiente angular da curva de calibração (BARBOSA et al., 2017; FABRE, 1999; GUEDES, 2015; ICH, 2014; MAPA, 2011; MARTINS, F. I. C. C.; BARBOSA, P. G. A.; ZOCOLO; NASCIMENTO, 2018; RIBANI et al., 2004).

$$\text{LOD} = 3,3 \frac{S_b}{a} \quad (1)$$

Já o limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração, na qual o analito pode ser quantificado com precisão e exatidão. Os mesmos métodos utilizados para a determinação de LOD podem ser utilizados para estimar LOQ. A Equação 2 estima o LOQ para o método baseado em parâmetros da curva analítica, onde  $S_b$  é o desvio padrão no intercepto em Y e  $a$  é o coeficiente angular da curva de calibração (BARBOSA et al., 2017; FABRE, 1999; GUEDES, 2015; ICH, 2014; MAPA, 2011; RIBANI et al., 2004).

$$\text{LOQ} = 10 \frac{S_b}{a} \quad (2)$$

A precisão do método verifica o grau de concordância entre os resultados de análises individuais repetidas do analito. Sua estimativa está associada aos erros aleatórios e a dispersão de resultados entre experimentos independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. As formas mais habituais de se calcular a precisão é através do coeficiente de variação (CV) (Equação 3), do desvio padrão (s) (Equação 4) e pelo intervalo de confiança da média (equação 5) (GUEDES, 2015; ICH, 2014; MAPA, 2011; RIBANI et al., 2004).

$$\text{CV}(\%) = \frac{s}{\bar{x}} 100 \quad (3)$$

Em que,  $S$  é o desvio padrão das medidas e  $\bar{x}$  = Concentração média:

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (4)$$

Em que,  $x_i$  é o valor de cada uma das medidas individuais,  $\bar{x}$  é o valor médio das medidas individuais e  $n$  é o número de medidas.

$$\text{Intervalo de confiança da média} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

Em que,  $\bar{x}$  é o valor médio das medidas individuais,  $t_{n-1}$  é o valor crítico da distribuição de Student com  $n-1$  graus de liberdade,  $s$  é a estimativa do desvio padrão das medidas e  $n$  é o número de medidas.

Por fim, a exatidão do método que mostra o grau de concordância entre as medidas individuais encontradas em cada experimento e um número de referência dito como verdadeiro. Vale ressaltar que o valor de referência é um valor obtido através de uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. Os métodos mais utilizados para verificar a exatidão são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão. A forma mais comum de se avaliar a exatidão é através da recuperação devido à dificuldade em obter materiais de referência certificados e nem sempre existem métodos na literatura passível de comparação, inviabilizando assim a analogia com outros métodos (GUEDES, 2015; ICH, 2014; MAPA, 2011; RIBANI et al., 2004).

### 3.6 Processo de *Downstream* de Lipopeptídeos

Além do aperfeiçoamento do processo fermentativo, a etapa de purificação deve ser examinada, a fim de diminuir os custos de obtenção dessas biomoléculas separadas. A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas envolve várias operações unitárias para atingir a pureza desejada do produto. De modo geral, as etapas que constituem o processo de *downstream* de produtos biotecnológicos são: separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo (clarificação), concentração e/ou purificação de baixa resolução; purificação de alta resolução e operações para o acondicionamento final do produto. No entanto, o desenvolvimento de tecnologias que diminuam o número de operações unitárias é de grande interesse para a indústria biotecnológica, uma vez que, o processo de *downstream* pode comprometer em até 80% do custo fabril do bioproduto (BALASUNDARAM; HARRISON, 2008).

Algumas metodologias são relatadas na literatura para a recuperação dos lipopeptídeos a partir do caldo fermentado livre de células, um dos métodos mais utilizados é a precipitação ácida que consiste na redução do pH do caldo fermentado livre de células, a aproximadamente 2, para que ocorra a precipitação dos lipopeptídeos. O ácido frequentemente utilizado para reduzir o pH é o HCl, na concentração de 6 M (ANG *et al.*, 2010; PATHAK *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014; SURENDRA *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2015). Após a precipitação ácida é realizada a centrifugação da amostra, e em seguida, o sobrenadante é descartado e o precipitado pode ser solubilizado com solvente orgânico, os mais utilizados são: metanol e etanol. O precipitado pode ser solubilizado também em água alcalina (NaOH) (PATHAK *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014; SURENDRA *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2015). A desvantagem deste método é o custo operacional, pois necessita de um tempo para que ocorra a precipitação dos compostos, além de necessitar de outras operações unitárias para se conseguir a recuperação das substâncias (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 2001; SILVA *et al.*, 2015). Entretanto, por se tratar de uma metodologia simples e de fácil execução é frequentemente utilizada para obtenção dos lipopeptídeos brutos.

### 3.6.1 *Técnicas de purificação das famílias de lipopeptídeos*

Com foi abordado no item 3.3.2, cada família de lipopeptídeo possui diferentes aplicabilidades e espectro de ação diferente, portanto, têm-se a necessidade de isolar cada família, para posteriormente, verificar a atividade antifúngica individual de cada família de lipopeptídeo.

A técnica convencionalmente utilizada para separar esses compostos é a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). O fundamento da separação dos lipopeptídeo por HPLC consiste na interação dos diferentes aminoácidos com diversas características hidrofílicas com a fase móvel. A fração com maior hidrofílicidade no anel peptídico será eluída em uma proporção inferior de metanol/acetonitrila. Por outro lado, a cadeia hidrofóbica (porção que contém o ácido graxo) irá combinar-se com o material de enchimento modificado de uma coluna C<sub>18</sub>, assim a fração que contém a cadeia de ácido graxo mais longa será mais difícil para eluir, sendo necessária uma proporção maior de metanol / acetonitrila. Iturinas, fengicinas, e surfactinas podem ser eluídas em 40-50%, 50-70%, e 85-100% acetonitrila em água, respectivamente, numa coluna C<sub>18</sub> em um sistema de HPLC (Yang *et al.*, 2015).

A cromatografia líquida é uma técnica que possibilita modificar alguns parâmetros cromatográficos e acessórios para ampliar a escala de isolamento. Assim, essa técnica pode ser dividida em três tipos de escala: a analítica, a semi-preparativa e a preparativa. O que distingue as escalas são alguns fatores utilizados no processo, como por exemplo, diâmetro da coluna e / ou dimensão das partículas, fluxo de processo, carga injetada entre outros. Sabe-se que o foco da escala analítica é definir os critérios de aceitação do método analítico de separação, assim visa obter uma ótima resolução cromatográfica dos picos em um curto intervalo de tempo, o método precisa ter precisão, especificidade, pureza e sensibilidade. Já a escala preparativa lida com colunas maiores, altas taxas de fluxo e maiores cargas de injeção, objetivando maximizar a taxa de produção, minimizar o consumo de solvente e os custos de mão-de-obra, entretanto, ao aumentar a taxa de fluxo pode ocorrer a diminuição da resolução dos picos cromatográficos, e quando se utiliza cargas muito altas pode ocorrer a sobrecarga da coluna, o que afeta tanto a resolução como a pureza do composto isolado (DONG, 2006; GRITTI *et al.*, 2018; HOSTETTMANN; MARSTON; HOSTETTMANN, 1998; JANDERA; KOMERS, 1997).

Deste modo, para realizar um processo de ampliação de escala faz-se necessário analisar alguns parâmetros de desempenho do processo, como por exemplo, consumo de solvente, produtividade, pureza e rendimento em massa visando verificar qual o limite ótimo do processo. Nos dias atuais, o uso da escala preparativa para fracionamento de famílias de lipopeptídeos não tem sido explorado, gerando uma grande escassez de trabalhos voltados para esses compostos. Apenas o estudo de DHANARAJAN *et al.*, 2016, aborda a ampliação da escala analítica para a semi-preparativa, entretanto, neste trabalho não foi abordado o consumo de solvente e nem produtividade para verificar a viabilidade de ampliação.

Outras pesquisas estão sendo desenvolvidas a fim de aumentar a recuperação e a pureza dos compostos obtidos. Estudos utilizando a adsorção para a separação e a purificação dos lipopeptídeos e de suas famílias (iturina, fengicina e surfactina) foram realizados (KALEAS; SCHMELZER; PIZARRO, 2010; BOWES; LENHOFF, 2011; DHANARAJAN; DU *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2013; RANGARAJAN; SEN, 2015; SOUSA *et al.*, 2015).

A adsorção é caracterizada pela capacidade do adsorvente em reter, através de interações físicas ou químicas, as moléculas de uma mistura favorecendo assim a separação dos compostos de interesse. O adsorvente é uma superfície sólida insolúvel, geralmente porosa e com alta área de superfície, capaz de efetuar em sua superfície a adesão de moléculas dispersas em um meio líquido ou gasoso (o adsorvido). As matrizes dos adsorventes normalmente têm formas esféricas regulares, com densidade relativamente elevada, de tamanho adequado e distribuição de tamanho, o que é apropriado para alta velocidade de funcionamento para encurtar o tempo de processamento. A escolha do adsorvente depende do tipo de composto a ser separado, pois é o adsorvente que trará a capacidade de seletividade do leito e proporcionará uma melhor eficiência do processo de purificação (ZHAO; YAO; LIN, 2009).

Alguns parâmetros devem ser considerados na escolha do adsorvente, como tamanho, densidade, capacidade de adsorção, alta área superficial específica, boa resistência mecânica, boa estabilidade química, dentre outras. De um modo geral, os três principais adsorventes utilizados são: carvão ativado, sílica-gel e zeólitas (YAHYA *et al.*, 2018; ZHAO; YAO; LIN, 2009)

Pesquisas abordam o sucesso da captura de proteínas com a resina de permuta de íons, a qual possui alta capacidade de força de ligação proporcionando a captura da proteína alvo diretamente. Entretanto o aumento da complexidade da interação proteína

ligante pode representar um desafio adicional para o desenvolvimento do método de dessorção (KALEAS; SCHMELZER; PIZARRO, 2010; BOWES; LENHOFF, 2011).

A cromatografia com resina de adsorção macroporosa foi utilizada com êxito para a separação de várias moléculas bioativas com base nas interações hidrofílicas / hidrofóbicas entre o soluto e a superfície da resina (DU *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2013). DHANARAJAN; RANGARAJAN; SEN, 2015, conseguiram separar e purificar simultaneamente três famílias de lipopeptídeos (iturina, fengicina e surfactina) utilizando a resina macroporosa HP-20 da empresa Sigma. A pureza das substâncias obtidas foram 68,3% (iturina), 77,6% (fengicina) e 91,6% (surfactina).

Algumas características marcantes da resina macroporosa incluem a alta capacidade de adsorção, boa estabilidade, baixa resistência fluida e fácil regeneração. A correta seleção da resina de adsorção macroporosa e uma ótima condição de funcionamento pode tornar este método eficiente para a recuperação de lipopeptídeos, bem como para a separação das famílias de lipopeptídeos de uma mistura. Este tipo de resina é comercialmente vendido por algumas empresas, as mais utilizadas são: XAD-4, XAD-7, HP-20, HP-2MG, HPD-100, HPD-300, D-101, AB-8, HPD-450, ADS-17, HPD-750, DM-130, HPD-500, e HPD-600 (DU *et al.*, 2012; DHANARAJAN; RANGARAJAN; SEN, 2015). ZHAO; DONG; SUN, 2009; GAO *et al.*, 2013, mostram a eficiência da cromatografia de modo misto, que utiliza mais de uma forma de interação entre a fase estacionária e o soluto alimentado no leito. A combinação das interações pode ser do tipo: interações iônicas, ligações de hidrogênio, interação de afinidade e interações hidrofóbicas. A resina de modo misto captura diretamente a proteína alvo com elevada condutividade 15-30 mS / cm sem a diluição ou adição de aditivos. Este tipo de resina é comercialmente vendido por algumas empresas, as mais utilizadas são: Capto MMC, Capto aderir e Capto Núcleo 700 da GE Healthcare, PPA HyperCel, HEA HyperCel e MEP HyperCel da Pall Corporation, Eshmuno HCX da Merck Millipore, Toyopearl MX-Trp-650 M de TOSOH Bioscience, e Nuvia cPrime, CHT cerâmica de hidroxiapatita, e CFT cerâmica fluoroapatite de Bio-Rad.

Entretanto, a utilização de resinas para a separação e a purificação de compostos possuem algumas desvantagens, como por exemplo: o custo elevado das resinas, dificuldade na dessorção do composto, perda de atividade da biomolécula entre outras. Assim, uma metodologia recente que se mostra atraente na separação dos lipopeptídeos é a cromatografia em contracorrente. A cromatografia em contracorrente (CCC) é uma ferramenta eficiente, rápida e econômica de obtenção de compostos com

alto grau de pureza, é uma técnica que permite a ampliação de escala e também evita alguns problemas frequentemente encontrados em sistemas cromatográficos comuns como, por exemplo: adsorção irreversível do soluto na fase estacionária, contaminação da amostra, reações indesejáveis, desativação da biomolécula entre outras (BRUNNER, 2009; JIANG et al., 2015; LIANG et al., 2015; SHIBUSAWA et al., 2006; WANG et al., 2011; ZHANG et al., 2015).

A CCC é um tipo de cromatografia de partição líquido-líquido que não necessita do uso de uma matriz sólida para ocorrer à separação dos compostos de interesse. O método é baseado na utilização de duas fases líquidas imiscíveis, onde uma é a fase móvel e a outra, a fase estacionária. A distribuição do soluto em cada uma das fases é determinada pelo coeficiente de partição (K), o valor de K é calculado baseado na relação da área do composto presente na fase topo e na fase fundo. A área do composto presente em cada uma das fases pode ser obtida através de análises em HPLC ou LC-MS. O cálculo de K é um importante parâmetro para escolha correta do sistema de solvente, pois quanto mais próximo o valor de K ficar de 1, melhor será o processo de separação. Por este motivo, quando se inicia um estudo de separação de compostos através da CCC o parâmetro principal a ser analisado para a escolha correta de um sistema de solvente é o valor de K (BRUNNER, 2009; COSTA et al., 2015; LIANG et al., 2015; SHIBUSAWA et al., 2006; WANG et al., 2011; YANAGIDA et al., 2007; YIN et al., 2013)

O sucesso da CCC depende da escolha correta do sistema de solvente. A escolha dependerá da polaridade do composto alvo a ser separado. LIANG *et.al.*, 2015 introduziram uma estratégia de seleção baseado numa matriz 9x9 contendo solventes fixos (hexano, acetato de etila, metanol e água), variando apenas suas proporções. Um sistema como este facilita a identificação adequada do sistema de solventes quando não se sabe a natureza química do composto a ser separado. Com o sistema de solvente corretamente escolhido, a etapa seguinte é realizar a separação do composto no cromatógrafo de contracorrente. Existem muitos tipos de cromatógrafos de contracorrente, os mais comuns são: cromatógrafo contracorrente gotas, cromatógrafo contracorrente de rotação locular, cromatógrafo contracorrente centrífuga de partição que pode ser espiral ou de cartucho (BRUNNER, 2009; INOUE et al., 2010; LEITÃO, 2005; LIANG et al., 2015; WANG et al., 2011; YIN et al., 2013).

Outra possibilidade de alavancar o fracionamento dessas famílias de lipopeptídeos é realizar a associação de técnicas convencionais com o objetivo de diminuir etapas e/ ou custos operacionais; é sabido que a cromatografia líquida de alta

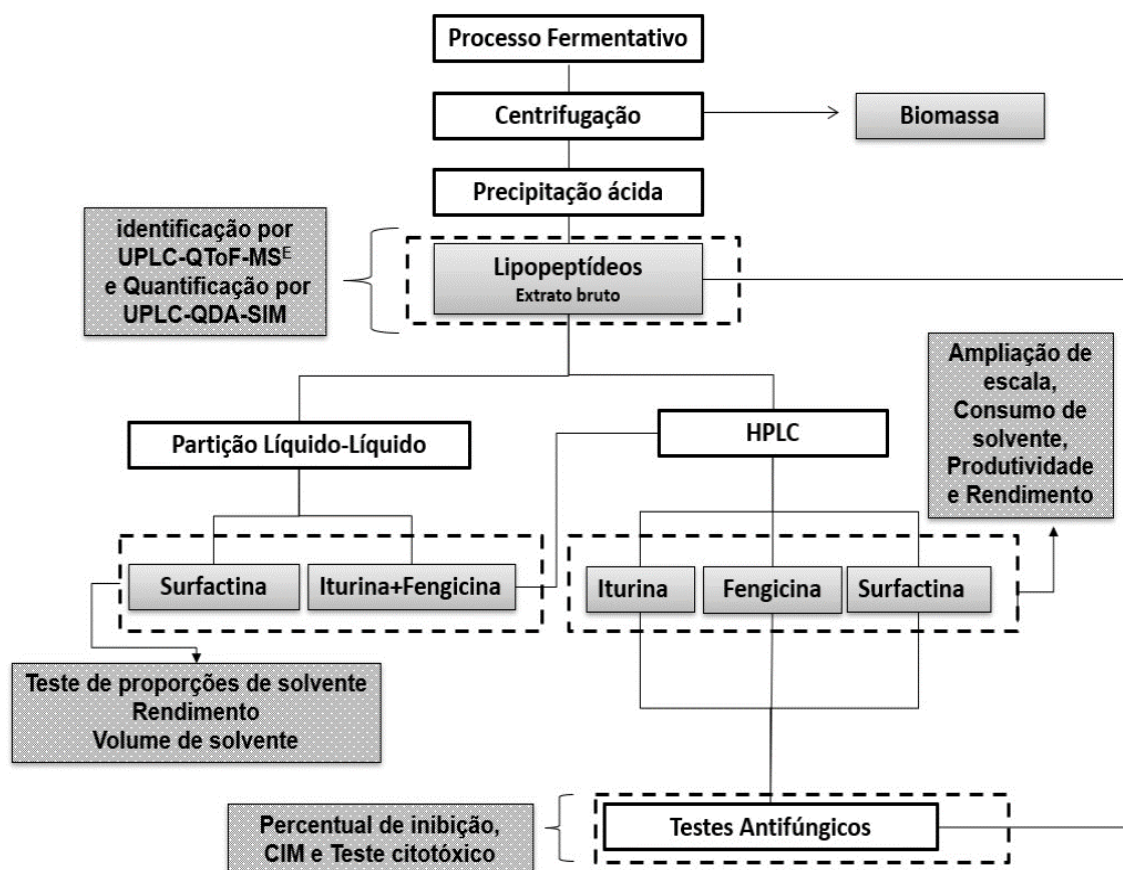


eficiência em fase reversa já é uma técnica consolidada na separação de famílias de lipopeptídeos, entretanto a associação dela com a partição líquido-líquido mostra-se uma alternativa para diminuir o consumo de solvente e tempo de processo. Contudo, é necessário avaliar alguns parâmetros de desempenho do sistema para verificar se a combinação dessas técnicas de separação irá proporcionar a diminuição dos custos de produção ou se utilizá-las separadamente é mais vantajoso. Os parâmetros de desempenho mais estudados são consumo de solvente, produtividade do sistema, rendimento em massa, recuperação e pureza dos compostos isolados (FENG et al., 1996; HOSTETTMANN; MARSTON; HOSTETTMANN, 1998; SZEKERES et al., 2013).

#### **4 Etapas da Tese**

A Figura 5 ilustra todas as etapas desenvolvidas na presente tese, que foi dividida em três artigos, sendo que no primeiro artigo foi desenvolvido e validado um método analítico de quantificação simultânea de três famílias de lipopeptídeos (iturina, fengicina e surfactina), suas isoformas e séries homólogas. Já no segundo artigo foi realizado a ampliação da escala de fracionamento das famílias de lipopeptídeos utilizando HPLC, tanto na escala semi-preparativa como na escala preparativa. Também se avaliou a utilização da partição líquido-líquido para a separação das famílias de lipopeptídeos e verificou a viabilidade de associação da partição com a HPLC. Por fim, o terceiro artigo aborda a verificação do potencial antifúngico dessas famílias de lipopeptídeos isoladas frente a linhagens que ocasionam perda econômicas na agricultura.

Figura 5- Fluxograma geral das etapas da tese.



Fonte: Autor, 2019.

#### 4.1 Quantificação simultânea de isoformas de lipopeptídeos por UPLC-MS em caldo fermentado por *Bacillus subtilis* CNPMS 22

---

Caroline Gondim de Souza, Fátima Itana Chaves Custódio Martins, Guilherme Julião Zocolo, José Edson Fontes Figueiredo, Kirley Marques Canuto, Edy Sousa de Brito

**Artigo publicado na revista:** Analytical and Bioanalytical Chemistry

Outubro 2018, Volume 410, Issue 26, pp 6827–6836

Doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1281-6>

---

#### RESUMO

A quantificação rápida e precisa de famílias de lipopeptídeos em amostras biológicas é um desafio. Apresentamos o desenvolvimento e a validação de um método para quantificação simultânea de três famílias de lipopeptídeos (iturinas, fengicinas e surfactinas) e suas isoformas, bem como a série homóloga. O método foi otimizado em UPLC-MS para uma temperatura de coluna a 65°C, volume de injeção de 5 µL e temperatura da amostra de 10°C. O modo SIM foi utilizado para detecção e quantificação de lipopeptídeos 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 entre 1435 e 1505 Da, os íons  $[M + 2H]^{2+}$  foram escolhidos para a identificação da fengicina. Os íons monitorados foram:  $m/z$  1043,5; 1057,5; 1071,5; 718,3; 725,4; 739,4; 732,4; 746,4; 753,4; 1008,6; 1022,6 e 1036,6. Os compostos foram separados por cromatografia líquida de fase reversa utilizando uma coluna analítica C<sub>18</sub> num tempo total de 19 min. As curvas padrões apresentaram-se lineares com  $r_w$  0,99 para todos os analitos. Precisão intra e inter-dia para amostras (50, 250 e 750 µg L<sup>-1</sup>) estavam dentro dos limites recomendados. O método analítico proposto foi capaz de quantificar simultaneamente 12 isoformas e séries homólogas de famílias de lipopeptídeos em amostras biológicas, tornando-se uma importante ferramenta industrial na avaliação de processos de produção de lipopeptídeos.

**Palavras-chaves:** Fengicina; Iturina; SIM; Surfactina.

## INTRODUÇÃO

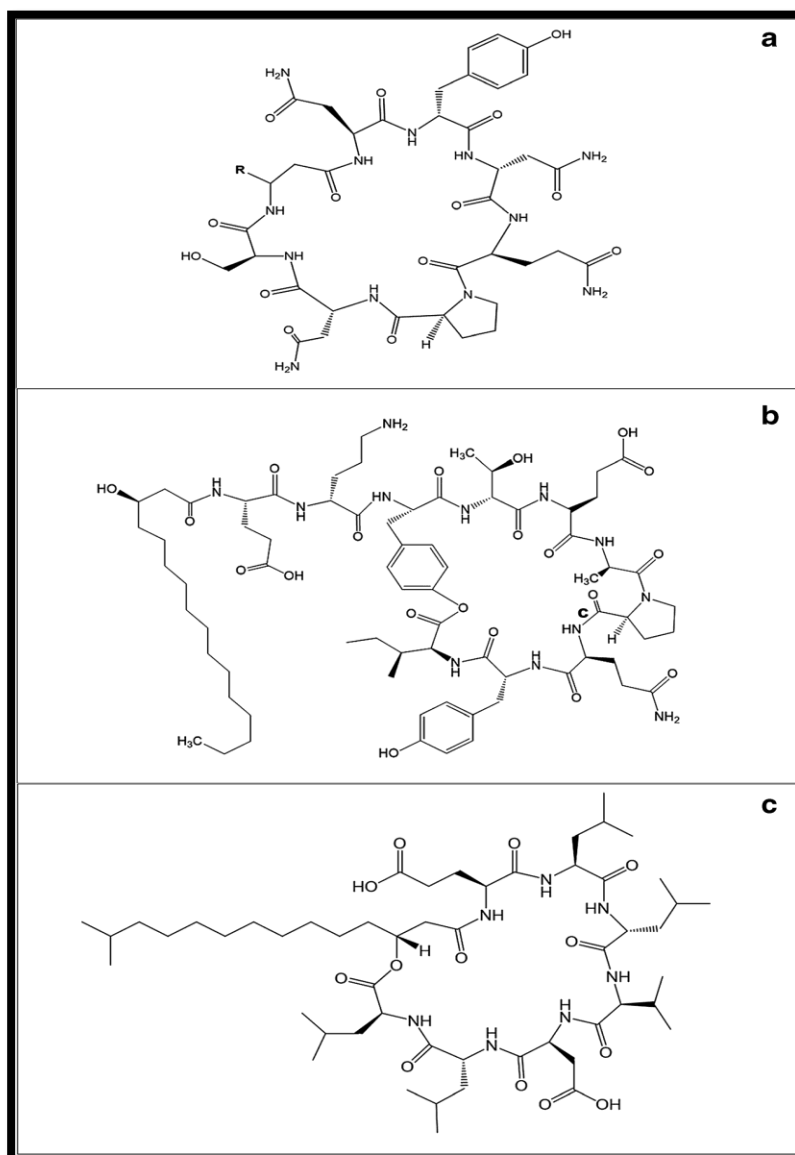
A busca por alternativas para o controle de doenças de pragas e plantas cresce substancialmente no mundo. Os produtos naturais são uma importante fonte de inspiração para a produção de biocidas, bem como para a síntese de novas substâncias com melhor atividade (CANTRELL; DAYAN; DUKE, 2012; MEENA; KANWAR, 2015; PATHAK et al., 2012; WETZEL et al., 2011). Um microrganismo que se destaca no controle de fitopatógenos é o *Bacillus subtilis*, devido ao seu potencial para produzir uma grande variedade de lipopeptídeos com atividade antifúngica (MEENA; KANWAR, 2015; PATHAK et al., 2012).

Lipopeptídeo são substâncias cíclicas contendo sete ou dez  $\alpha$ -aminoácidos ligados a uma cadeia de ácidos graxos variando de C<sub>13</sub>-C<sub>16</sub> para a surfactina, C<sub>14</sub>-C<sub>17</sub> para iturinas e C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub>, no caso das fengicinas (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010) (Figura 6). O número de átomos de carbono na composição dos aminoácidos da porção peptídica divide os lipopeptídeos em isoformas. As isoformas podem ainda ser subdivididas em séries homólogas, que diferem no número de átomos de carbono da cadeia alifática (BEHARY et al., 2012; JACQUES, 2011). As iturinas e fengicinas apresentam um espectro de ação contra vários tipos de fungos fitopatogênicos, principalmente contra os fungos filamentosos (KAWAGOE et al., 2015), (RANGARAJAN; DHANARAJAN; SEN, 2015). A surfactina, que é o principal representante da família dos lipopeptídeos, possui atividade antibiótica, antitumoral, antiviral e ação inibidora de toxinas (MEENA; KANWAR, 2015).

A produção de lipopeptídeos por *B. subtilis* é frequentemente realizada via fermentação. No entanto, as condições ótimas do processo fermentativo dependem do lipopeptídeo de interesse. Portanto, o desenvolvimento de um método analítico capaz de quantificar as famílias de lipopeptídeo é importante para monitorar os parâmetros fermentativos que afetam sua produção, sendo assim uma ferramenta útil para o estabelecimento de pesquisas de processos industriais. Atualmente, existem poucos métodos para quantificar os lipopeptídeos, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis e UPLC-MS (BINIARZ; ŁUKASZEWICZ, 2017; GEISLER et al., 2017; MENG et al., 2015b; YUAN et al., 2011). No entanto, esses métodos quantificam apenas uma família específica de cada vez, ou a mistura de apenas uma isoforma de cada família. Sabe-se que o processo de fermentação pode levar a

produção de várias isoformas e séries homólogas. Apenas um estudo até o presente momento avaliou a quantificação simultânea apenas dos análogos de surfactina e iturina (DENG et al., 2017). Uma técnica atrativa para a quantificação dessas isoformas e séries homólogas de lipopeptídeos é a utilização de cromatografia líquida com o monitoramento de íons (SIM), uma vez que facilita a quantificação simultânea das substâncias alvo em uma única corrida cromatográfica (YAO et al., 2016). O objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar um método analítico capaz de quantificar as isoformas e séries homólogas da família dos lipopeptídeos utilizando o UPLC-QDA no modo SIM.

Figura 6- Estruturas das principais classes de lipopeptídeos de *Bacillus subtilis*: iturina A (a), fengicina (b) e surfactina (c).



Fonte: Autor, 2019.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Reagentes

Os reagentes utilizados foram: iturina (pureza  $\geq 95\%$ ), fengicina (pureza  $\geq 90\%$ ) e surfactina (pureza  $\geq 98\%$ ), ácido fórmico P.A. (pureza  $\geq 99,7\%$ ) e metanol P.A. (pureza  $\geq 99,8\%$ ), adquirida à Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA); acetonitrila (pureza 99,9%), foram obtidos de Tedia (Fairfield, Ohio, EUA); água purificada de um sistema Millipore Advantage A10 (Molsheim, França).

### Preparo dos padrões

Soluções estoques individuais dos três lipopeptídeos foram preparadas por dissolução de cada composto em metanol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). Em seguida, uma solução mix dos padrões foi preparada em uma concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em metanol. A curva de calibração dos compostos foi preparada diluindo a mistura da solução padrão em metanol. Todas as soluções foram armazenadas a  $-80^\circ \text{C}$ .

### Identificação dos lipopeptídeos

Os padrões e suas soluções de mistura foram analisados em um sistema Acquity UPLC acoplado a um Sistema Xevo Quadrupolo / Tempo de Voo (UPLC-QToF-MS<sup>E</sup>) (Waters Corp, Milford, MA, EUA). Os lipopeptídeos foram separados em coluna Acquity UPLC C<sub>18</sub> BEH (150 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) (Waters Corp, Milford, MA, EUA) mantida a  $40^\circ \text{C}$ . A fase móvel empregada foi água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B). O gradiente variou de 2 a 95% B (v / v) ao longo de 0 a 15 minutos, com vazão de  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ . O volume de injeção da amostra foi de  $5 \mu\text{L}$ . O espectrômetro de massa foi operado no modo MS<sup>E</sup> centróide. Os espectros de massa foram registados no modo ESI<sup>+</sup>, numa gama de massas de 120-1800 Da, temperatura da fonte ajustada a  $120^\circ \text{C}$ , temperatura de solvatação de  $350^\circ \text{C}$ , fluxo do gás de solvatação de  $500 \text{ L h}^{-1}$ , tensão do cone de 0,5 V; e voltagem capilar de 2,6 kV. A encefalina leucina foi usada como massa de bloqueio. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation). As amostras foram filtradas através de membranas de PTFE de  $0,22 \mu\text{m}$  (Millipore®).

## **Desenvolvimento do Método Cromatográfico usando UPLC-QDA-SIM**

Os padrões de lipopeptídeos e a solução de mix dos padrões foram analisados utilizando um sistema Acquity UPLC com um detector QDA (Waters Corp, Milford, MA, EUA). A separação foi realizada em coluna BEH C<sub>18</sub> (150 x 2,1 mm; 1,7 μm) (Waters Corp, Milford, MA, EUA). O método foi otimizado para alcançar maior sensibilidade e resolução dos picos cromatográficos e os parâmetros finais estabelecidos foram ajustados para temperatura da coluna a 65 ° C, volume de injeção de 5 μL e temperatura da amostra de 10 ° C. O gradiente de eluição foi calculado com base nas condições de HPLC previamente estabelecidas por Yang (YANG et al., 2015) com adaptações, visando obter a separação efetiva das diferentes famílias de lipopeptídeos, bem como de suas isoformas e séries homólogas. Utilizou-se uma combinação de solventes contendo 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B), com vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup>. O gradiente estabelecido foi: 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). Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo numa gama de massa entre 350-1250 Da.

O modo SIM foi utilizado para detecção e quantificação dos lipopeptídeos 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 entre 1435 e 1505 Da, os íons  $[M + 2H]^{2+}$  foram escolhidos para a identificação de fengicinas. O valor da massa para  $[M + 2H]^{2+}$  foi calculado usando o software MassLynx V4.1. Os valores das massas utilizadas em UPLC-qTOF e UPLC-QDA, bem como os tempos de janela que são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4- Massa dos lipopeptídeos (UPLC-QTOF-MS) e íons de monitoramento correspondentes (UPLC-QDA-SIM) com janelas de tempo.

Lipopeptídeos	UPLC-QTOF-MS <sup>E</sup>					UPLC-QDA-SIM			Referência	
	Tempo	[M + H] <sup>+</sup>	Fragmentos	Formula	Erro ppm	Tempo	[M + H] <sup>+</sup>	[M + 2H] <sup>2+</sup>		Janela de detecção
Iturina A2	7.85	1043.5638	299/638/801/ 915	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub>	2.4	8.94	1043.5		8.44–9.44	(MONACI et al., 2016; YE et al., 2012)
Iturina A3–A5	8.46	1057.5830	–	C <sub>49</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub>	–2.5	9.34	1057.5		8.80–9.80	(MONACI et al., 2016; ZHAO et al., 2013)
Iturina A6–A7	8.95	1071.5951	212/666/829	C <sub>50</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub>	1.8	9.82	1071.5		9.30–10.30	(MONACI et al., 2016; ZHAO et al., 2013)
Fengicina A	8.41	1435.7896	966/1080	C <sub>70</sub> H <sub>107</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	4.4	9.92		718.3	9.30–10.30	(BIE; LU; LU, 2009)
Fengicina A	8.74	1449.8052	966/1080	C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	0.3	10.04		725.4	9.55–10.55	(BEN AYED et al., 2015; BIE; LU; LU, 2009)
Fengicina B	9.20	1477.8330	994/1180	C <sub>73</sub> H <sub>112</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	7.6	10.44		739.4	10.00–11.00	(MONACI et al., 2016; WANG et al., 2004)
Fengicina A	9.47	1463.8185	966/1080	C <sub>72</sub> H <sub>110</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	3.4	10.66		732.4	9.92–10.92	(MONACI et al., 2016; WANG et al., 2004)
Fengicina B	9.79	1491.8557	994/1180	C <sub>74</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	5.4	10.68		746.4	10.18–11.18	(BIE; LU; LU, 2009; MONACI et al., 2016)
Fengicina B	10.22	1505.8713	994/1180	C <sub>75</sub> H <sub>116</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	1.1	10.90		753.4	10.40–11.04	(WANG et al., 2004)
Surfactina	14.81	1008.6646	455/667/895	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	–0.5	14.26	1008.6		13.75–14.75	(MA; HU, 2015; MONACI et al., 2016)
Surfactina	15.36	1022.6836	355/582/796/ 909	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	0.9	14.76	1022.6		14.22–15.22	(MA; HU, 2015; MONACI et al., 2016)
Surfactina	15.80	1036.6954	441/685/923	C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	2.3	15.06	1036.6		14.57–15.57	(MONACI et al., 2016; PATHAK; KEHARIA, 2014)

Fonte: Autor, 2019.



## Validação do Método

O protocolo de validação foi estabelecido de acordo com o método recomendado pela International Conference Harmonization (ICH) (ICH, 2014) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Brasileiro (MAPA) (MAPA, 2011), com base na linearidade, precisão (intra-dia e inter-dia), repetibilidade e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). A seletividade foi avaliada através da análise de amostras em branco e amostras fortificadas com soluções padrões mistas de iturina, fengicina e surfactina.

### Linearidade

As curvas de calibração foram preparadas usando uma diluição seriada da solução padrão para concentrações de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 500, 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As áreas dos íons de quantificação foram usadas para os cálculos. Como os padrões utilizados são misturas de isoformas de cada família de lipopeptídeos, as curvas foram plotadas com base na área relativa de cada isoforma em cada concentração. Portanto, as áreas de cada família de lipopeptídeos foram somadas e divididas pela área individual de cada composto para determinar a concentração.

A homogeneidade das variâncias (homocedasticidade) foi estimada pelo teste F de acordo com as Equações 6 e 7:

$$F_{cal} = \frac{s_2^2}{s_1^2} \quad (6)$$

$$F_{tab} = (f_1, f_2 ; 0,95) \quad (7)$$

Em que, o valor F calculado ( $F_{cal}$ ) é expresso como a razão entre a variação máxima ( $s_2^2$ ) e mínima ( $s_1^2$ ) obtida para todos os níveis de concentração. O valor F tabelado ( $F_{tab}$ ) é obtido para o nível de confiança de 95% e  $f_1 = f_2 = (n - 1)$  graus de liberdade. Se as variâncias são constantes ao longo da faixa de calibração, significa que o modelo é homocedasticidade ( $F_{cal} < F_{tab}$ ). O teste *tr* verificar o ajuste do modelo linear para as curvas de calibração foi realizado pela estatística *t* usando a seguinte equação 3 e

comparado com o valor  $t$  tabelado ( $\alpha = 0,05$ ;  $\nu = n - 2$ ), onde  $r$  é o coeficiente de correlação e  $n$  é o número de níveis de calibração (Equação 8).

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (8)$$

Se o valor de  $tr$  para a regressão da curva de calibração for maior ou igual a  $t_{\text{crit}}$  (tabulado), para um nível de confiança de 95% em  $(n - 2)$  graus de liberdade, considera-se que o modelo de calibração linear é ajustado. Neste caso, a hipótese nula  $H_0$ :  $r = 0$  que não há correlação entre  $x$  e  $y$ , é rejeitada (BARBOSA et al., 2018; MARTINS, F. I. C. C.; BARBOSA, P. G. A ; ZOCOLO; NASCIMENTO, 2018).

### Teste de adequação de precisão e sistema

A precisão do método foi avaliada por meio de repetibilidade e precisão intermediária (intra e inter dia). A avaliação foi realizada pelo primeiro grau de concordância entre os resultados de medidas sucessivas (dez vezes) nas mesmas condições com a concentração de  $750 \mu\text{g L}^{-1}$ . A precisão foi avaliada quantitativamente pelo coeficiente de variação CV (%) calculado para três níveis de concentração  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  (nível mais baixo),  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  (nível intermediário) e  $750 \mu\text{g L}^{-1}$  (nível mais alto), em medições sucessivas (seis vezes) nas mesmas condições, assim como os desvios padrão da repetibilidade ( $r$ ) e então os coeficientes de variação (CV) para cada analito foram calculados de acordo com as Equações 9 e 10, respectivamente (ICH, 2014).

$$r = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (9)$$

$$CV(\%) = \frac{Sr}{xX} \cdot 100 \quad (10)$$

Em que,  $x_i$  é o valor para cada concentração em cada réplica para cada nível de concentração  $i$ ,  $\bar{X}$  são valores médios de concentração em um dado nível  $i$ ,  $n$  é o número replicado em cada nível e  $Sr$  é o desvio padrão de repetibilidade. As condições de repetitividade e o coeficiente de variação devem ser inferiores a dois terços dos valores de acordo com o intervalo de concentração (MAPA, 2011).

## **Limites de detecção e quantificação**

O método de avaliação visual, uma das três abordagens mais comuns, foi usada para determinar o limite de detecção e quantificação. O método da relação sinal-ruído e o desvio padrão da resposta e da inclinação, embora usuais, não foram empregados neste estudo. O LOD e LOQ com base na avaliação visual foram estimados através da análise de amostras com concentrações de analito conhecidas e estabelecendo o nível mínimo por meio de diluições sucessivas em que o analito pode ser detectado de forma confiável (YE et al., 2012).

## **Quantificação de lipopeptídeos em meio de cultura**

Triplicatas reais de um processo fermentativo foram produzidos para testar o método de quantificação proposto. *Bacillus subtilis* CNPMS 22 (da coleção de microrganismos multifuncionais e fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo, código identificador BRM033307). A cepa foi cultivada em meio LB (lisogeny broth) sólido (triptona 10 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup> e ágar 15 g L<sup>-1</sup>) e incubado a 30 °C por 18 h. Para produzir o pré-inóculo, uma colônia isolada foi inoculada em 150 mL de meio líquido LB (triptona 10 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g L<sup>-1</sup> e NaCl 10 g L<sup>-1</sup>) e incubado a 30 ° C sob agitação a 150 rpm por 18 h. Para a produção dos lipopeptídeos, 10 mL do pré-inóculo foram inoculados em erlenmeyer de 2 L, contendo 1 L de meio líquido LB com glicose (20 g L<sup>-1</sup> de glicose, 10 g L<sup>-1</sup> de triptona, 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e NaCl 10 g L<sup>-1</sup>, pH = 7) e incubou-se sob agitação a 150 rpm durante um período de 72 h a 30 ° C. Após esse período, a biomassa foi removida por centrifugação (2671 g por 15 min). A extração dos metabólitos do caldo fermentado foi realizada por precipitação ácida, adicionando-se 6 M HCl para reduzir o pH para 2 e então armazenado no refrigerador por 24 horas. A suspensão foi centrifugada (3488 g durante 30 min) e o precipitado contendo os lipopeptídeos foi liofilizado. As amostras foram preparadas na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> em metanol e filtradas através de membranas PTFE de 0,22 µm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação dos padrões

A análise de UPLC-qTOF-MS<sup>E</sup> (Tabela 4) das três soluções lipopeptídicas dos padrões revelou que o padrão de iturina tem três homólogos, exibindo íons moleculares:  $m/z$  1043.5;  $m/z$  1057.5 e  $m/z$  1071.5, enquanto o padrão de fengicina mostrou seis isoformas, devido à presença dos seguintes íons moleculares  $m/z$  1435.7;  $m/z$  1449.8;  $m/z$  1477.8;  $m/z$  1463.8;  $m/z$  1491.8; e  $m/z$  1505.8. Como as massas moleculares das fengicinas excederam o limite de detecção do massas do QDA (até 1250 Da), esta família de lipopeptídeos foi monitorada através das suas moléculas duplamente protonadas  $[M + 2H]^{2+}$ . Portanto, as fengicinas foram monitoradas através de íons em  $m/z$  718.3;  $m/z$  725.4;  $m/z$  739.4;  $m/z$  732.4;  $m/z$  746.4; e  $m/z$  753.4. Para o padrão de surfactina, três isoformas foram detectadas e monitoradas em  $m/z$  1008.6;  $m/z$  1022.6; e  $m/z$  1036.6.

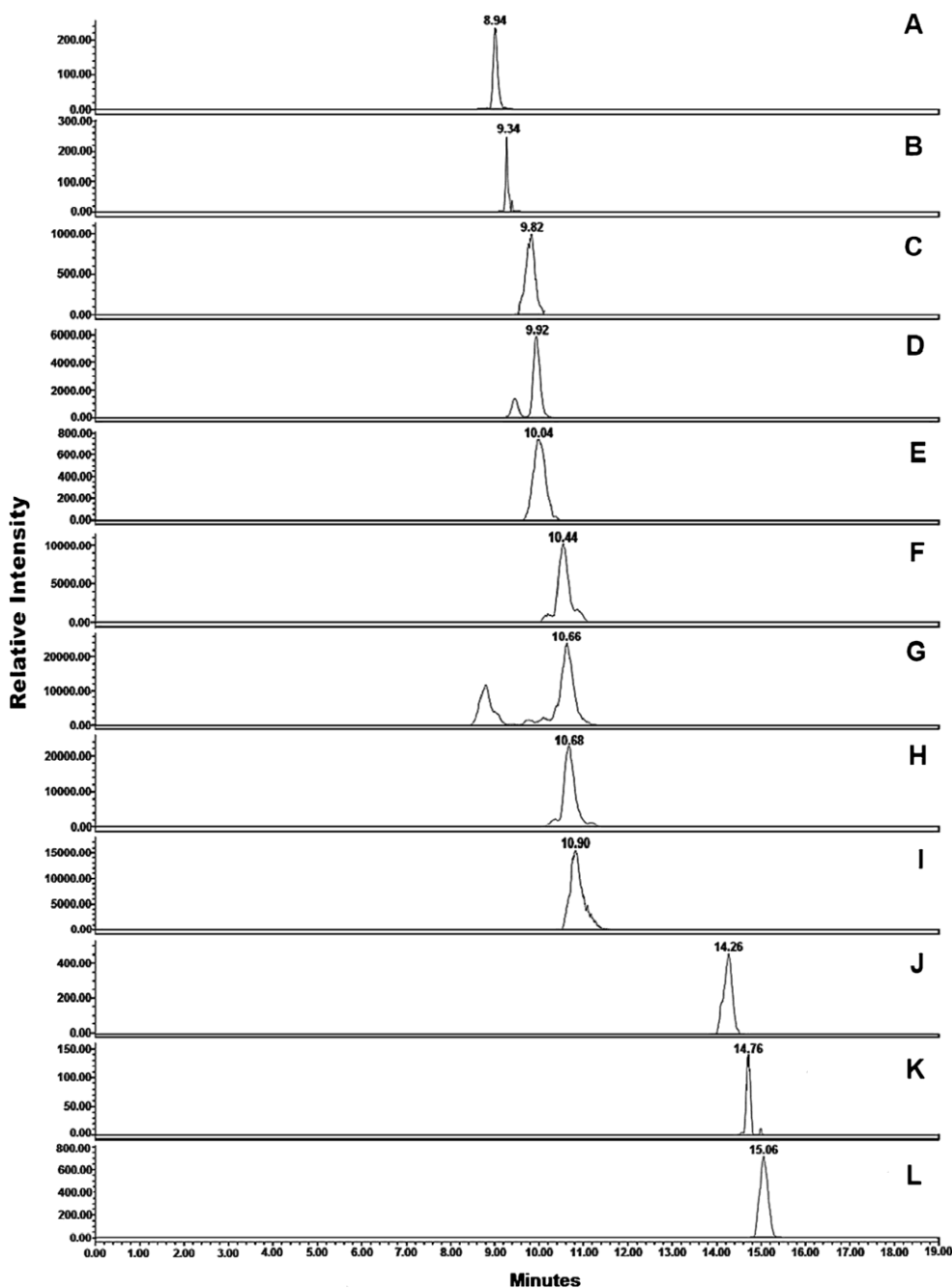
### Desenvolvimento do método no UPLC-QDA-SIM

O presente estudo explorou a viabilidade de usar UPLC-QDA no modo SIM para quantificar iturina, fengicina e surfactina simultaneamente. Entretanto, os lipopeptídeos possuem isoformas e homólogos estruturais, o que dificulta sua quantificação simultaneamente em um caldo fermentado de *B. subtilis*.

Primeiramente, a separação cromatográfica do lipopeptídeo foi otimizada para obter uma separação robusta e assegurar a homogeneidade do pico. Nesta etapa, a sensibilidade e a resolução dos picos foram examinadas através da verificação da influência da temperatura da coluna (40 e 65 °C), volume de injeção (2  $\mu$ L e 5  $\mu$ L) e temperatura da amostra (10 e 20 °C). As condições que forneceram menos interferência e melhor sensibilidade foram o ajuste da temperatura da coluna a 65 °C, volume de injeção de 5  $\mu$ L, que aumentou a sensibilidade de pico; e temperatura da amostra a 10 °C (Figura 7). O método foi seletivo no monitoramento de cada isoforma e série homóloga de famílias de lipopeptídeos (Tabela 4). A detecção dos íons fengicinas  $[M + 2H]^{2+}$  foi um fator crucial na quantificação. Portanto, ao monitorar os íons  $[M + 2H]^{2+}$ , foi possível validar o método de quantificação de fengicinas simultaneamente com a iturina e a

surfactina. O gradiente de eluição favoreceu a separação das três famílias de lipopeptídeos e seus análogos. A ordem de eluição foi iturina, fengicina e surfactina, respectivamente. De acordo com cada tempo de retenção, a janela de tempo de monitoramento de cada íon foi estabelecida (Tabela 4).

Figura 7- Os espectros SIM combinados de UPLC-QDA, apresentando 12 lipopéptidos de *Bacillus subtilis*. (A) Iturina A2  $m/z$  1043,5. (B) Iturina A3-A5  $m/z$  1057,5. (C) Iturina  $m/z$  1071,5. (D) Fengicina A  $m/z$  718,3. (E) Fengicina A  $m/z$  725,4. (F) Fengicina B  $m/z$  739,4. (G) Fengicina A  $m/z$  732,4. (H) Fengicina B  $m/z$  746,4. (I) Fengicina B  $m/z$  753,4. (J) Surfactina  $m/z$  1008,6. (K) Surfactina  $m/z$  1022,6. (L) surfactina  $m/z$  1036,6.



Fonte: Autor, 2019.

Uma boa linearidade dentro das faixas foi obtida para cada analito, com um bom coeficiente de correlação (0,9931 e 0,9968) e pelo teste  $t$  para verificar a qualidade do ajuste dos modelos lineares (mínimos quadrados ponderados e normais) (Tabela 5). O coeficiente de correlação estava de acordo com os valores aceitos ( $r_w \geq 0,99$ ) (ICH, 2014). O teste  $t$  de Student para significância dos parâmetros de regressão, bem como o teste  $F$  para verificar a homogeneidade das variâncias (nível de confiança de 95%), garantiram a qualidade da curva analítica (Tabela 5). No entanto, deve-se ter cuidado ao usar padrões lipopeptídeos, uma vez que eles podem apresentar homólogos e consequentemente superestimar a concentração de lipopeptídeos.

Tabela 5- Avaliação estatística do estudo de linearidade da análise de lipopeptídeos de *Bacillus subtilis* por UPLC-QDA-SIM.

Lipopeptides	Ion <i>m/z</i>	Curvas de calibração <sup>a</sup>	Regressão	<i>r<sub>w</sub></i>	Limites ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	<i>t<sub>r</sub></i>	<i>T<sub>crit</sub></i> ( $\alpha = 0.05$ )	<i>F<sub>calc</sub></i>	<i>F<sub>crit</sub></i> ( $f = 3; k = 11;$ $\alpha = 0.05$ )
Iturina A2	1043.5	$y = 55.27x - 259.70$	MMQP <sup>b</sup>	0.9968	38 – 268	24.94	2.78 ( $\nu = 4$ ) <sup>a</sup>	71.7	62 (k=6)
Iturina A3–A5	1057.5	$y = 55.20x - 82.23$	MMQP	0.9951	5 – 365	28.47	2.31 ( $\nu = 8$ )	348.7	104 (k=10)
Iturina A6–A7	1071.5	$y = 67.75x - 178.42$	MMQO <sup>c</sup>	0.9931	2 – 75	26.91	2.37 ( $\nu = 7$ )	57.7	93.9 (k=9)
Fengicina A	718.3	$y = 166.5 x - 119.2$	MMQO	0.9957	1 – 50	28.44	2.78 ( $\nu = 7$ )	30.3	93.9 (k=9)
Fengicina A	725.4	$y = 168.13 x - 256.13$	MMQO	0.9956	5 – 70	23.76	2.57 ( $\nu = 5$ )	39.2	72.9 (k=7)
Fengicina B	739.4	$y = 167.35 x - 829.18$	MMQO	0.9955	14 – 259	25.73	2.45 ( $\nu = 6$ )	61.6	83.5 (k=8)
Fengicina A	732.4	$y = 154.26 x - 72.87$	MMQP	0.9963	7 – 147	28.40	2.45 ( $\nu = 6$ )	113.5	83.5 (k=8)
Fengicina B	746.4	$y = 164.72 x - 533.83$	MMQO	0.9941	2 – 288	25.92	2.31 ( $\nu = 8$ )	60.3	104 (k=10)
Fengicina B	753.4	$y = 167.34 x - 598.66$	MMQO	0.9953	9 – 185	25.18	2.45 ( $\nu = 6$ )	49.5	83.5 (k=8)
Surfactina	1008.6	$y = 57.97 x - 9.33$	MMQO	0.9954	7 – 77	23.23	2.57 ( $\nu = 5$ )	38.7	72.9 (k=7)
Surfactina	1022.6	$y = 57.44 x + 44.68$	MMQP	0.9964	2 – 200	33.24	2.31 ( $\nu = 8$ )	350.4	104 (k=10)
Surfactina	1036.6	$y = 64.92x - 655.79$	MMQO	0.9963	43 – 449	23.18	2.78 ( $\nu = 4$ )	56.2	62 (k=6)

a) Equações estimadas para as curvas de calibração pelo coeficiente de correlação WLS (*r<sub>w</sub>*), intervalo linear, o parâmetro calculado *t<sub>r</sub>* e valor crítico *t<sub>crit</sub>* para graus de liberdade  $\nu$  (estimado em  $n-2$ ) e o parâmetro calculado *F*, assim como seu valor crítico *F<sub>crit</sub>*.

b) Método ponderado mínimo.

c) Método dos mínimos quadrados.

Fonte: Autor, 2019.

A precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação CV (%) obtido para os valores das áreas das corridas inter-dia e intra-dia para três níveis de concentração (Tabela 6). O CV (%) da área do pico variou entre 1,69 e 17,50% para o menor nível de concentração, entre 1,86 e 44,24% para a concentração intermediária e entre 1,27 e 6,33% para a maior concentração. A precisão intra e inter-dia das amostras ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $750 \mu\text{g L}^{-1}$ ) estava dentro dos limites aceitáveis, exceto para o valor máximo do nível intermediário (ICH, 2014; MAPA, 2011).

Tabela 6- Precisão intra e inter dia dos lipopeptídeos em matrizes biológicas (coeficiente de variação - CV%).

Lipopeptídeos	Ion <i>m/z</i>	CV (%)		
		Nível 1 ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$ )	Nível 2 ( $250 \mu\text{g L}^{-1}$ )	Nível 3 ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ )
Iturina A2	1043.5	10.93	4.75	5.08
Iturina A3-A5	1057.5	9.11	4.14	3.32
Iturina A6-A7	1071.5	17.50	13.76	6.33
Fengicina A	718.3	4.84	44.24	3.87
Fengicina A	725.4	2.29	2.59	3.01
Fengicina B	739.4	2.72	5.98	2.96
Fengicina A	732.4	1.69	1.86	1.27
Fengicina B	746.4	3.44	8.50	3.21
Fengicina B	753.4	2.04	3.06	2.45
Surfactina	1008.6	7.48	4.77	2.62
Surfactina	1022.6	10.81	9.83	3.89
Surfactina	1036.6	16.81	7.14	3.85

Fonte: Autor, 2019.

Os valores de LOD e LOQ foram estimados com base no método visual. O LOD é definido como a menor concentração de um analito responsável por uma distinção entre sinal e ruído em uma observação visual. O LOQ é a menor concentração que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. Este parâmetro define o limite superior da previsão. O intervalo de intercepção corresponde ao sinal analítico crítico (associado à provável concentração de LOD por um certo nível de confiança) (YE et al., 2012). Os valores de LOD e LOQ variaram de 0,2 a  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  e de 1 a  $43 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 7).



Tabela 7- Limites de detecção e quantificação de lipopeptídeos (método baseado no desvio padrão).

Lipopeptídeos	Ion <i>m/z</i>	Limite ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD	LOQ
Iturina A2	1043.5	38 – 268	3.00	38.00
Iturina A3-A5	1057.5	5 – 365	2.00	5.00
Iturina A6-A7	1071.5	2 – 75	1.00	2.00
Fengicina A	718.3	1 – 50	0.20	1.00
Fengicina A	725.4	5 – 70	0.20	5.00
Fengicina B	739.4	14 – 259	1.50	14.00
Fengicina A	732.4	7 – 147	0.70	7.00
Fengicina B	746.4	2 – 288	1.50	2.00
Fengicina B	753.4	9 – 185	1.00	9.00
Surfactina	1008.6	7 – 77	0.60	7.00
Surfactina	1022.6	2 – 200	1.00	2.00
Surfactina	1036.6	43 – 449	2.00	43.00

Fonte: Autor, 2019.

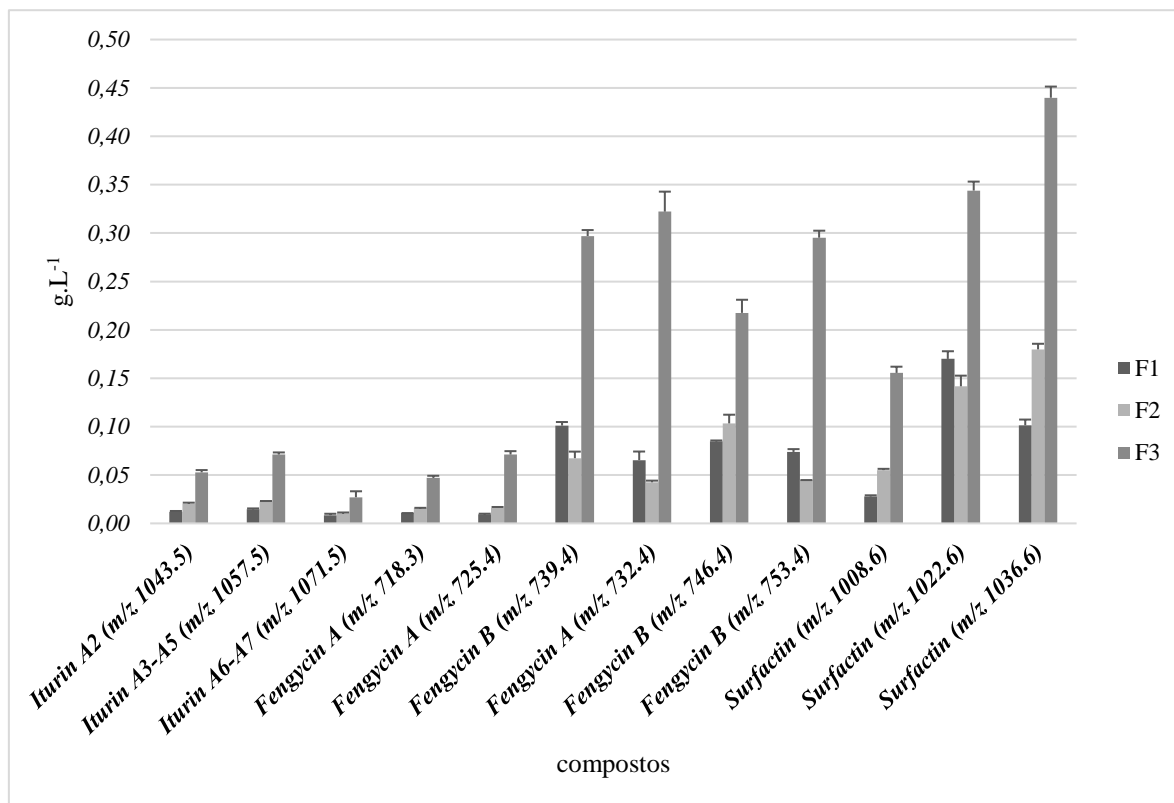
O método validado foi capaz de quantificar simultaneamente 12 isoformas e séries homólogas de iturina, fengicina e surfactina em uma única corrida cromatográfica, com tempo total de análise de 19 min, sendo seletivo, com um nível adequado de sensibilidade e uma preparação simplificada da amostra. Um estudo validou a quantificação simultânea de análogos de surfactina e iturina, quantificando sete análogos de lipopeptídeos, com tempo total de análise de 12 min e faixa de LOD de 0,37-2,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e LOQ de 1,24-5,23  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sendo menos sensível em comparação aos resultados aqui apresentados (LOD de 0,0002-0,003  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e LOQ 0,001-0,043  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (DENG et al., 2017).

### Quantificação de lipopeptídeos

Três diferentes fermentações (F1, F2 e F3) foram analisadas pelo método de quantificação proposto (Figura 8). Observou-se uma diferença entre o lipopéptido produzido em cada lote. A amostra F3 apresentou maior quantidade de lipopeptídeos, apresentando um valor máximo de 0,31  $\text{mg g}^{-1}$  para a surfactina (*m / z* 1036,6). Para este mesmo composto, a fermentação F1 apresentou uma concentração 4,4 vezes menor (0,07  $\text{mg g}^{-1}$ ) do que a F3; e a fermentação F2 apresentou uma concentração 2,8 vezes menor (0,11  $\text{mg g}^{-1}$ ) do que a F3. O mesmo foi observado para a fengicina A (*m / z* 732,4), que

apresentou concentração máxima de  $0,23 \text{ mg g}^{-1}$ . Para este mesmo composto, a fermentação F1 apresentou uma concentração 5,75 vezes menor ( $0,04 \text{ mg g}^{-1}$ ) do que a F3; e a fermentação F2 apresentou uma concentração 11,5 vezes menor ( $0,04 \text{ mg g}^{-1}$ ) do que a F3. A produção de iturina foi mínima nos três lotes de fermentação quando comparada com as outras famílias de lipopeptídeos.

Figura 8-Concentração de iturina, fengicina e surfactina presentes no caldo de três diferentes fermentações *Bacillus subtilis* CNPMS 22.



Fonte: Autor, 2019.

Sabe-se que parâmetros fermentativos, como a fonte de carbono e nitrogênio; condições operacionais como pH, temperatura, agitação e oxigenação; e a concentração de micronutrientes como P, Fe, S, Mg e Mn influenciam significativamente a síntese de lipopeptídeos, refletindo o tipo e a quantidade de cada família, isoforma e séries homólogas produzidas (CHEN; JUANG; WEI, 2015; INÈS; DHOUBA, 2015; RANGARAJAN; DHANARAJAN; SEN, 2015). Assim, é importante ressaltar a necessidade de um método de quantificação para ser utilizado como controle de qualidade, bem como na avaliação de processos fermentativos na produção de famílias de lipopeptídeos. Em geral, os valores de produção de lipopeptídeos são encontrados na

faixa de 0,175 a 4,94 g.L<sup>-1</sup> (DENG et al., 2017; HUANG et al., 2015; RANGARAJAN; DHANARAJAN; SEN, 2015; SHIH et al., 2009). Valor na mesma ordem de grandeza foi encontrado no presente estudo, mostrando que o método de quantificação desenvolvido é adequado à escala de produção de lipopeptídeos por fermentação.

## CONCLUSÃO

O método cromatográfico desenvolvido foi capaz de quantificar simultaneamente 12 isoformas e séries homólogas de famílias de lipopeptídeos presentes em amostras biológicas utilizando um UPLC-QDA-SIM. A validação do método mostrou a viabilidade de utilizar o padrão externo para monitorar e quantificar as famílias de lipopeptídeos produzidos pela *B. subtilis* CNPMS22. O método desenvolvido pode ser útil para o controle de qualidade industrial da produção de lipopeptídeos. Finalmente, deve-se ter cuidado ao usar padrões de lipopeptídeos, pois eles podem apresentar homólogos e conseqüentemente superestimar a concentração de lipopeptídeos.

## 4.2 Ampliação de escala no fracionamento de famílias de lipopeptídeos por cromatografia líquida associada a partição líquido-líquido

### RESUMO

A pouca representatividade dos fungicidas naturais no mercado consumidor se deve ao elevado custo do produto, que é uma consequência das despesas da etapa de *Downstream*. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi ampliar a escala de fracionamento das famílias de lipopeptídeos utilizando HPLC, tanto na escala semi-preparativa como na escala preparativa, além do estudo que avaliou a utilização da partição líquido-líquido para a separação das famílias de lipopeptídeos analisando a viabilidade de associação da partição com a HPLC. Para os testes de ampliação de escala na cromatografia líquida foram testadas duas colunas C<sub>18</sub>, uma em escala semi-preparativa (250 mm x 10 mm; 10µm) e outra em escala preparativa (100 mm x 19 mm; 10µm). Diferentes cargas de injeção foram utilizadas para avaliar a possibilidade de ampliação (20, 40, 60 e 80 mg). Nesta etapa foram avaliados o consumo de solvente, produtividade e rendimento. Na partição foram realizados testes de proporções de solvente visando determinar a proporção ideal para a separação dos lipopeptídeos. Os resultados indicaram que a ampliação da carga de injeção pode ser realizada até 60 mg, em ambas as escalas. Comparando os resultados obtidos entre as escalas, notou-se que na escala preparativa o consumo de solvente foi 4 vezes maior (4,35 mL mg<sup>-1</sup>) quando comparado ao da escala semi-preparativa (1 mL mg<sup>-1</sup>), porém sua produtividade foi 2 vezes superior (0,0084 kg dia<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>), isso para a carga de 60 mg. Resultados satisfatórios foram apresentados pela partição líquido-líquido na obtenção da família de surfactina. A associação da HPLC com a partição líquido-líquido é vantajosa quando se trabalha em escala preparativa, particionando inicialmente 20 mg, pois considerando uma produção contínua de 24 h, teremos uma economia de tempo suficiente para realizar mais sete corridas cromatográficas e também uma economia de solvente para realizar mais cinco corridas cromatográficas, tornando o processo mais produtivo. Portanto, pode-se concluir que é possível ampliar a escala de fracionamento dos lipopeptídeos, principalmente, para a escala preparativa com a carga de 60 mg. É viável também realizar a associação da partição líquido-líquido com HPLC, alavancando assim o processo de fracionamento das famílias de lipopeptídeos.

**Palavras-chaves:** consumo de solvente; cromatografia preparativa; produtividade.

### INTRODUÇÃO

A aplicação exagerada de produtos químicos nas lavouras está deixando de ser uma questão relacionada especificamente à produção agrícola e está se transformando em um problema de saúde pública e da preservação da natureza. Assim, a busca por alternativas para o controle de fitopatógenos cresce substancialmente no mundo. Uma

alternativa é o uso dos metabólitos secundários produzidos por microrganismos, pois representa uma importante fonte na busca de compostos naturais com potencial para o controle de fitopatógenos. Uma das bactérias mais amplamente utilizadas no controle de fitopatógenos é o *Bacillus subtilis*, pois possui a capacidade de produzir uma grande variedade de famílias de lipopeptídeos com atividade antifúngica (CAO et al., 2012; CAWOY et al., 2015; CHINTKUNTLA, 2015; FIGUEIREDO et al., 2010; MEENA; KANWAR, 2015; ONGENA; JACQUES, 2008).

Lipopeptídeos são um grupo de surfactantes que possuem em sua estrutura básica uma cadeia de peptídeos ligados a ácidos graxos. Existem várias famílias de lipopeptídeos, entretanto as mais comuns são: iturina, fengicina e surfactina (DHANARAJAN; RANGARAJAN; SEN, 2015; JACQUES, 2011). As famílias de lipopeptídeos são substâncias cíclicas de sete ou dez  $\alpha$ -aminoácidos ligados a uma cadeia de ácidos graxos que podem variar de C<sub>13</sub> a C<sub>16</sub> para a surfactina, de C<sub>14</sub> a C<sub>17</sub> para a iturina e de C<sub>14</sub> a C<sub>18</sub>, no caso da fengicina (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010). Os lipopeptídeos apresentam inúmeras aplicações, como por exemplo, as iturinas atuam como agentes no controle biológico, apresentando um espectro de ação contra vários tipos de fungos fitopatogênicos, principalmente contra os tipos filamentosos (KAWAGOE et al., 2015; SOUZA et al., 2018). Fengicina atua no controle de doenças em plantas, exibindo ação antifúngica, especificamente contra fungos filamentosos (RANGARAJAN; DHANARAJAN; SEN, 2015; SOUZA et al., 2018). Surfactina que é o principal representante da família dos lipopeptídeos, apresenta ação antibiótica, antitumoral, antiviral e inibidora de toxinas (MEENA; KANWAR, 2015; SOUZA et al., 2018).

Apesar da gama de aplicações dos lipopeptídeos, há pouca representatividade desses compostos na indústria, devido ao elevado custo do produto, que geralmente é uma consequência das despesas da etapa de *Downstream* da molécula alvo, que de modo geral, correspondem a cerca de 50 a 90% dos custos de produção (PESSOA; KILIKIAN, 2005). Portanto, há um grande interesse na otimização do processo de purificação desses compostos em larga escala. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) já é uma técnica consolidada na separação dos lipopeptídeos (DHANARAJAN et al., 2016b; MALFANOVA et al., 2012; YANG et al., 2015), entretanto, é um método que necessita da utilização de equipamentos e colunas cromatográficas relativamente caras, assim há um grande interesse na busca de alternativas para diminuir o custo do processo de separação desses compostos. Uma técnica convencional atraente para viabilizar o

processo de separação desses compostos é a partição líquido-líquido, pois é um método simples, entretanto, esse método também apresenta algumas desvantagens como: utilização de solventes caros e o elevado custo no investimento com segurança são as maiores problemáticas enfrentadas em escala industrial (MARSOUSI et al., 2019).

Contudo, visando aperfeiçoar o processo de separação das famílias de lipopeptídeos é de suma importância verificar qual a técnica de separação é a mais vantajosa, assim faz-se necessário analisar o consumo de solvente, produtividade e rendimento, bem como verificar a viabilidade tanto da ampliação de escala de isolamento como também realizar a associação das duas técnicas de separação (HPLC e partição líquido-líquido), visando diminuir o consumo de solvente e aumentar a produtividade dos compostos isolados. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi ampliar a escala de fracionamento das famílias de lipopeptídeos utilizando HPLC, tanto na escala semi-preparativa como na escala preparativa, associado a partição líquido-líquido para a separação das famílias, verificando a viabilidade de associação da HPLC com a partição líquido-líquido.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Reagentes

Os reagentes utilizados foram metanol HPLC (pureza  $\geq 99,9\%$ ), adquirido da LiChrosolv® (Alemanha); acetonitrila HPLC (pureza 99,9%) obtido de Tedia (Fairfield, OH, EUA); água purificada de um sistema Millipore Advantage A10 (Molsheim, França); n-hexano P.A. (pureza 98%) adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA) e acetato de etila P.A. (pureza 99,8%) adquirida da Dinâmica (Brasil).

### Lipopeptídeos

Os lipopeptídeos foram produzidos pelo *Bacillus subtilis* CNPMS 22 (da coleção de microrganismos multifuncionais e fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo, código identificador BRM033307). O processo fermentativo, bem como a extração e identificação dos compostos está descrito no trabalho realizado por SOUZA et al., (2018).

### Sistema em escala semi-preparativa

Inicialmente foram realizados testes de fracionamento das famílias em escala semi-preparativa, na qual os compostos foram separados utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O equipamento utilizado é munido de uma bomba (marca: Waters 2555 Quarternary Gradiente Module); injetor manual (marca: Waters Preparative Chromatografy rack); detector UV (marca: Waters 2489 UV/ visible Detector) e um coletor automático (Waters Fraction Collector III). Foi utilizada uma coluna C<sub>18</sub> semi-preparativa (250 mm x 10 mm; 10 $\mu$ m) (marca: Supelco; n° 12395-01). A separação das famílias de lipopeptídeos foi realizada seguindo o método proposto por YANG et al. (2015) com adaptações. A fase móvel foi constituída de água (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados com 0,1% de ácido trifluoroacético e a composição do gradiente utilizada foi: 0-3 min, 55% (A); 3-8 min, 50% (A); 8-15.5 min, 20% (A); 15.5-16.5, 12% (A); 16.5-20 min, 0% (A); 20-30 min, 55% (A). As cargas de injeção trabalhadas foram: 20, 40, 60 e 80 mg. Os extratos foram solubilizados em metanol e filtrados em filtro Millipore® de membrana de PTFE com poro de 0,22  $\mu$ m. Foram realizadas cinco injeções de 400  $\mu$ L para cada carga de injeção testada. O fluxo utilizado foi de 4 mL min<sup>-1</sup> e o comprimento de onda utilizado foi de 205 nm. Inicialmente foram feitos testes de tempos de coleta das frações, em que se coletou amostras a cada um

minuto, posteriormente essas amostras foram avaliadas por espectrometria de massas (UPLC-QToF-MS<sup>E</sup>) e assim foram estabelecidos os tempos de coleta ideal para cada família de lipopeptídeo que foram: 2-8 min para as iturinas; 8,1-15,9 para as fengicinas e 16-22 min para as surfactinas. As frações obtidas foram evaporadas e liofilizadas. Os extratos liofilizados foram armazenados a -18°C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **Sistema em escala preparativa**

Os testes em escala preparativa foram conduzidos no mesmo equipamento utilizado na escala semi-preparativa e nas mesmas condições descritas na seção anterior, entretanto a coluna utilizada foi uma C<sub>18</sub> preparativa (100 mm x 19 mm; 10µm) (marca: Water Xselect). O volume de cada injeção foi de 1 mL, o fluxo utilizado foi de 10 mL min<sup>-1</sup> e o comprimento de onda de 205 nm. Os tempos de coleta para cada família de lipopeptídeo foram de 2-5 min para as iturinas, 7-14 para as fengicinas e 14,5-22 min para as surfactinas. As frações obtidas foram evaporadas e liofilizadas. Os extratos liofilizados foram armazenados a -18°C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **Partição líquido-líquido**

Primeiramente foi avaliado o melhor sistema de solventes a ser utilizado na partição líquido-líquido para a separação das três famílias (iturina, fengicina e surfactina). O sistema de solventes, bem como as proporções escolhidas foi baseado em experimentos da literatura (LIANG et al., 2015). Inicialmente, 2 mg do extrato bruto de lipopeptídeo, obtido por precipitação ácida do caldo de fermentado foram adicionados aos tubos de ensaio. Os solventes utilizados foram n-hexano, acetato de etila, metanol e água, nas seguintes proporções: (3: 7: 3: 7), (5: 5: 5: 5), (7: 3: 7: 3), (1: 9: 2: 8), (1: 9: 3: 7), (2: 8: 2: 8) e (2: 8: 3: 7) (v / v / v / v), respectivamente. As amostras foram homogeneizadas em vórtex, por 1 minuto, e em seguida, esperou-se a separação completa das fases. Posteriormente, a fase topo e a fase fundo foram completamente separadas e filtradas através de filtro de PTFE (0,22µm) e injetadas em UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>. Para verificar a viabilidade de separação dos compostos foi calculado o coeficiente de partição (k), que foram determinados pela razão entre a área do pico de cada compostos na fase topo pela



área do pico de cada compostos na fase fundo. Foi avaliado também a quantidade de solvente utilizado para particionar, como também o rendimento em massa. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### Parâmetros de desempenho

O consumo de solvente e a produtividade foram calculados de acordo com o método descrito na literatura (JOSÉ et al., 2006; OIRAM FILHO, 2017). Os cálculos do consumo de solvente foram realizados de acordo com o gradiente utilizado e os parâmetros como vazão volumétrica, tempo de execução, porcentagem de solvente orgânico e massa de produtos obtidos de cada carga de injeção a partir do extrato bruto obtido na fermentação (Equação 10).

$$SC = \frac{\Sigma V_{parcial}}{m_{lip}} \quad (10)$$

Em que, SC é o consumo de solvente total expresso em mL mg<sup>-1</sup> de lipopeptídeos, m<sub>lip</sub> é a massa total de lipopeptídeo utilizada em cada carga de injeção e V<sub>parcial</sub> foi calculado através da Equação 11:

$$V_{parcial} = \frac{t_p \cdot Q \cdot G_p}{100} \quad (11)$$

Em que, V<sub>parcial</sub> é o volume de solvente orgânico parcial gasto em mL; t<sub>p</sub> é o tempo parcial referente a cada faixa de gradiente em min; Q é o fluxo volumétrico utilizado no processo em mL.min<sup>-1</sup> e G<sub>p</sub> é a porcentagem de solvente orgânico utilizado no gradiente de eluição correspondente a cada faixa de gradiente.

A produtividade do HPLC foi expressa em g h<sup>-1</sup> do lipopeptídeo fracionado por g<sup>-1</sup> de adsorvente, a qual foi calculada considerando os parâmetros fluxo volumétrico, massa adsorvente da coluna e concentração dos lipopeptídeos (Equação 12).

$$Pr = \frac{Q \cdot C_{lip}}{m_{ad}} \quad (12)$$

Em que, Pr é a produtividade do sistema, Q é um fluxo volumétrico (mL min<sup>-1</sup>) do sistema, C<sub>lip</sub> é concentração de lipopeptídeo (mg mL<sup>-1</sup>) presente em cada carga de injeção, m<sub>ad</sub> é a massa adsorvente da coluna.

O rendimento total em massa dos lipopeptídeo foi calculado por meio da Equação 13:

$$R_{mfl} (\%) = \frac{\Sigma m_{obt.}}{m_{injetada.}} \cdot 100 \quad (13)$$

Em que,  $R_{mfl}$  (%) é o rendimento em massa da família de lipopeptídeo,  $m_{obt.}$  é o somatório das massas obtidas de cada família de lipopeptídeo após o fracionamento e  $m_{injetada.}$  massa utilizada para fracionar.

Um dos parâmetros de desempenho a ser considerado como medida comparativa para avaliar a viabilidade de associação da HPLC com a partição líquido-líquido é a análise do consumo de solvente. No entanto, não é possível calcular o consumo de solvente, através da Equação 10, para a partição líquido-líquido, pois sabe-se que na partição não temos os termos Q e % sol, assim foi realizado o estudo da quantificação do volume de solvente orgânico total gasto em cada técnica, e posteriormente correlacionou-se os dados para verificar a possibilidade de associação das duas técnicas.

Para realizar a quantificação do volume de solvente orgânico parcial gasto na HPLC, inicialmente foi determinado o volume de solvente parcialmente gasto correspondente a cada mudança de faixa do gradiente de eluição. Posteriormente, realizou-se o somatório dos volumes de solventes parciais para obter o volume total de solvente gasto na corrida cromatográfica. O volume parcial do solvente gasto foi calculado através da Equação 11.

A quantidade de solvente orgânico total gasto na partição líquido-líquido foi calculada através do somatório do volume de cada solvente orgânico utilizado. A proporção de solvente utilizada como base para este cálculo foi a (2:8:2:8) (v/v/v/v), que foi a proporção ideal estabelecida no pré-teste para separar a família de surfactina das famílias de iturinas e fengicinas.

### **Análise LC-MS**

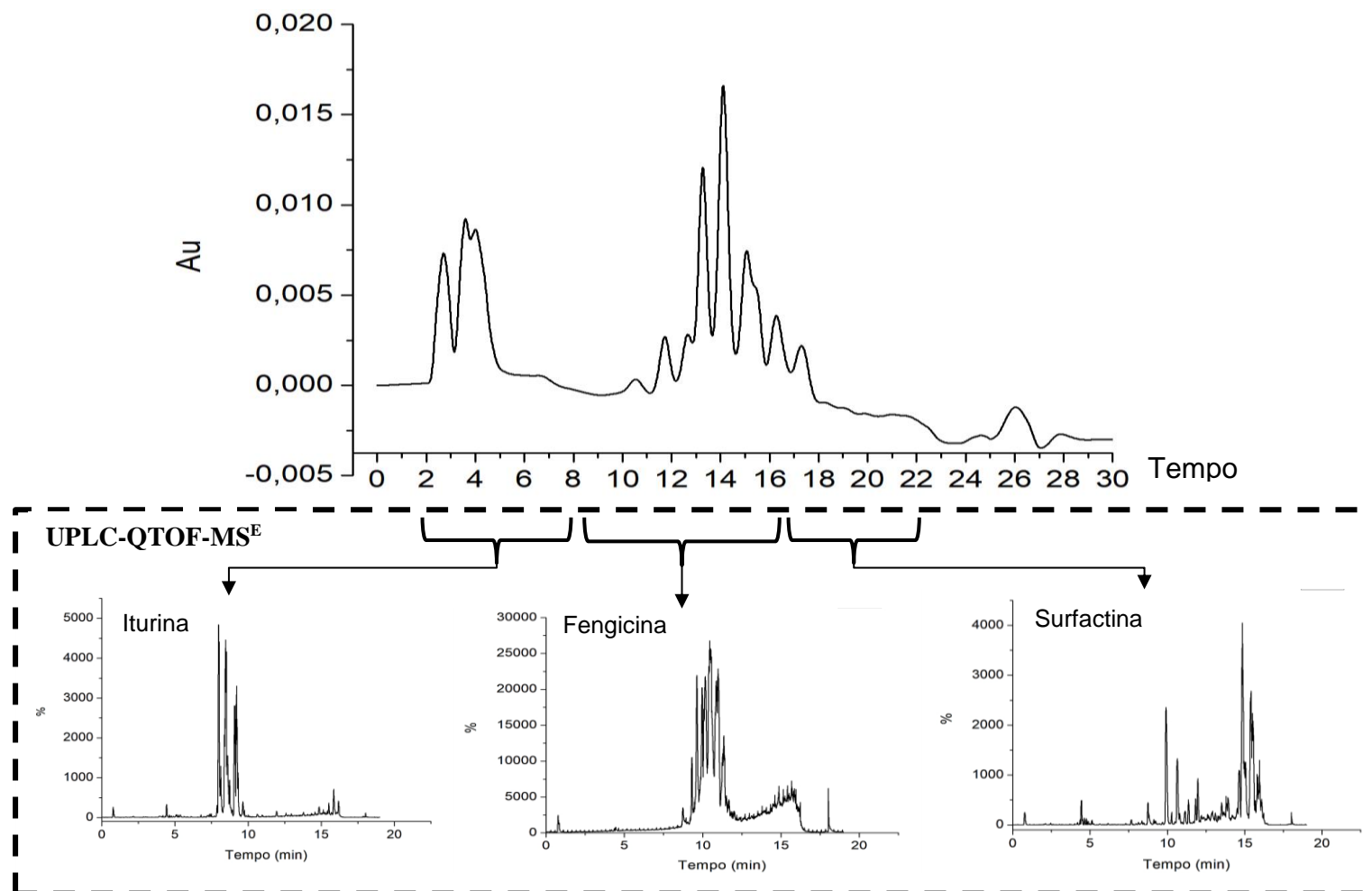
Os compostos isolados foram identificados através de um sistema Aquity UPLC acoplado a um Sistema Xevo Quadrupolo / Tempo de Voo (UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>) (Waters Corp, Milford, MA, EUA), nas mesmas condições descritas por SOUZA et al., (2018).

## RESULTADO E DISCUSSÃO

### Fracionamento em escala semi-preparativa

A Figura 9 ilustra o cromatograma obtido na HPLC, bem como os cromatogramas obtidos de cada fração isolada analisado por UPLC-QToF-MS<sup>E</sup>. Inicialmente foi realizado um teste para determinar o tempo ideal de coleta, que revelou que os tempos de 2-8 min é ideal para coletar as iturinas; 8,1-15,9 min para as fengicinas e 16-22 min para as surfactinas, assim o método adaptado mostrou-se viável para isolar simultaneamente as três famílias de lipopeptídeos, corroborando com os dados obtidos por YANG et al., 2015.

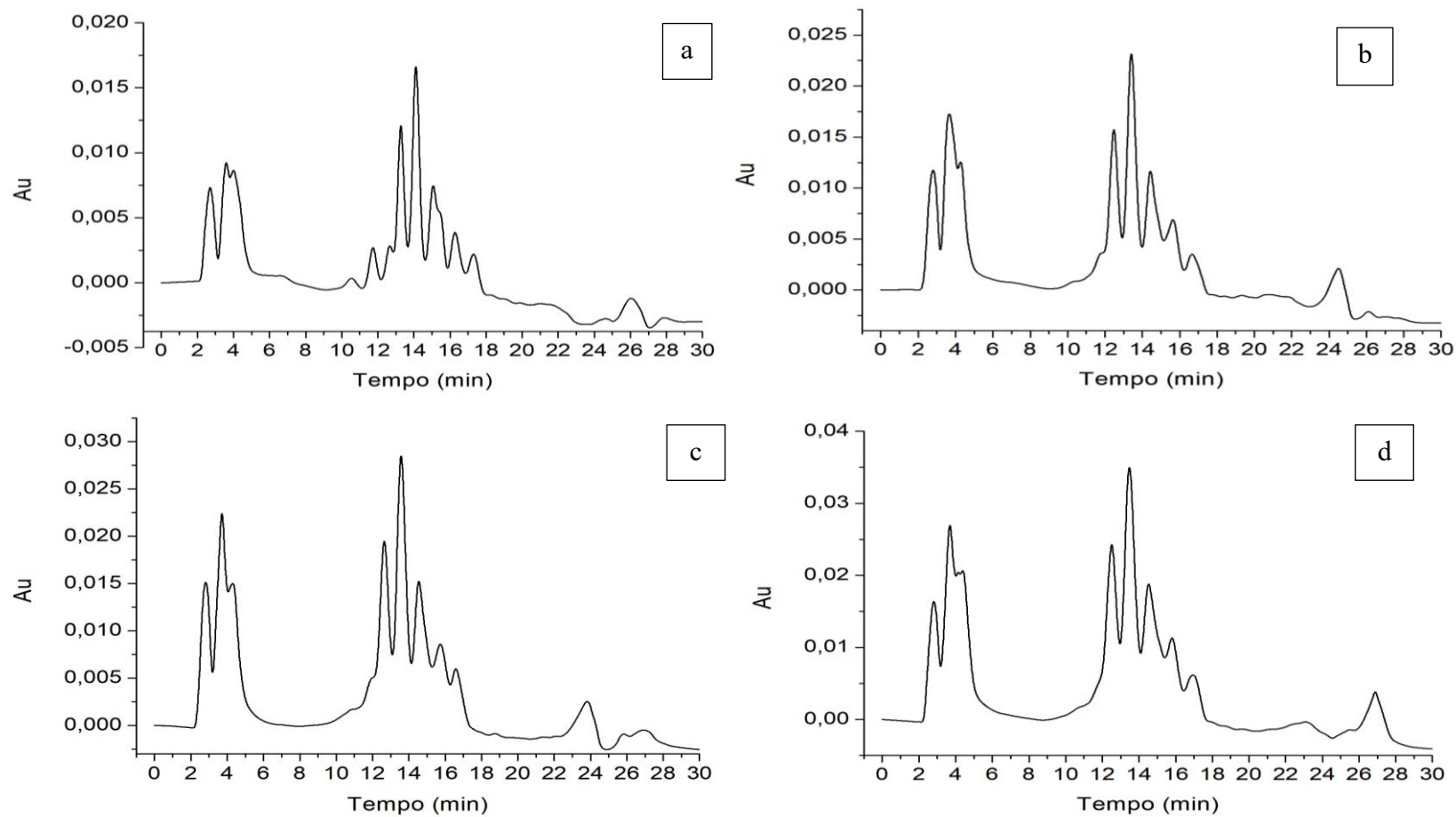
Figura 9-Cromatograma obtido na HPLC em escala semi-preparativa (carga de 20mg) a 205 nm, e os respectivos cromatogramas obtidos na UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> de cada fração isolada.



Fonte: Autor, 2019.

Visando obter uma maior produtividade na separação das famílias de lipopeptídeos e um menor consumo de solvente foi realizado um estudo de ampliação de escala, na qual diferentes cargas de injeção foram utilizadas (20, 40, 60 e 80 mg). Através da Figura 10 nota-se que o perfil cromatográfico sofreu pequenas alterações com o aumento da carga, como por exemplo, nas cargas de 20 mg para a de 40 mg, que apresentou um aumento da intensidade dos picos e coeluição na família das fengicinas (Figura 10 A e B). Para as cargas de 40 até 80 mg manteve-se o perfil cromatográfico, similar ao de 40 mg (Figura 10 C e D). Contudo, não houve deslocamento no tempo de retenção com o aumento da carga injetada, assim os tempos de coleta permaneceram os mesmos da Figura 9.

Figura 10- Cromatogramas da ampliação de escala com a coluna semi-preparativa. (a) carga de 20 mg; (b) carga de 40 mg; (c) carga de 60 mg e (d) 80 mg.



Fonte: Autor, 2019.

A Tabela 8 mostra os valores de consumo de solvente e a produtividade para as diferentes cargas de injeção trabalhadas, na escala semi-preparativa. Para o consumo de solvente os resultados obtidos foram 3,49, 1,60, 1,00 e 1,02 mL mg<sup>-1</sup>, para as cargas de 20, 40, 60 e 80 mg, respectivamente. Estes valores evidenciaram um comportamento decrescente, desde a carga de 20 mg até a carga de 60 mg, o que significa uma viabilidade no aumento da carga até este ponto. No entanto, a expectativa de decréscimo no consumo de solvente para a injeção de 80 mg não foi evidenciada. Com relação a produtividade, podemos visualizar que ocorreu um aumento da produtividade à medida que aumenta a cargas injetadas até o limite de 60 mg (Tabela 8), na qual os valores variaram de 0,0012 até 0,0048 kg dia<sup>-1</sup> por kg de adsorvente. Porém, na carga de 80 mg não demonstrou aumento de produtividade, corroborando com o resultado obtido do consumo de solvente para a mesma carga injetada. Portanto, com base nestes resultados pode-se ampliar a carga de injeção até 60 mg. O comportamento verificado tanto para consumo de solvente quanto para a produtividade são comuns em cromatografia (KIWALA et al., 2016; WEEDEN; WANG, 2015), à medida que se aumenta a carga de injeção, ocorre uma economia de solvente e ao mesmo tempo um ganho na produtividade, trazendo assim uma possibilidade de alavancar o processo de separação de famílias de lipopeptídeos.

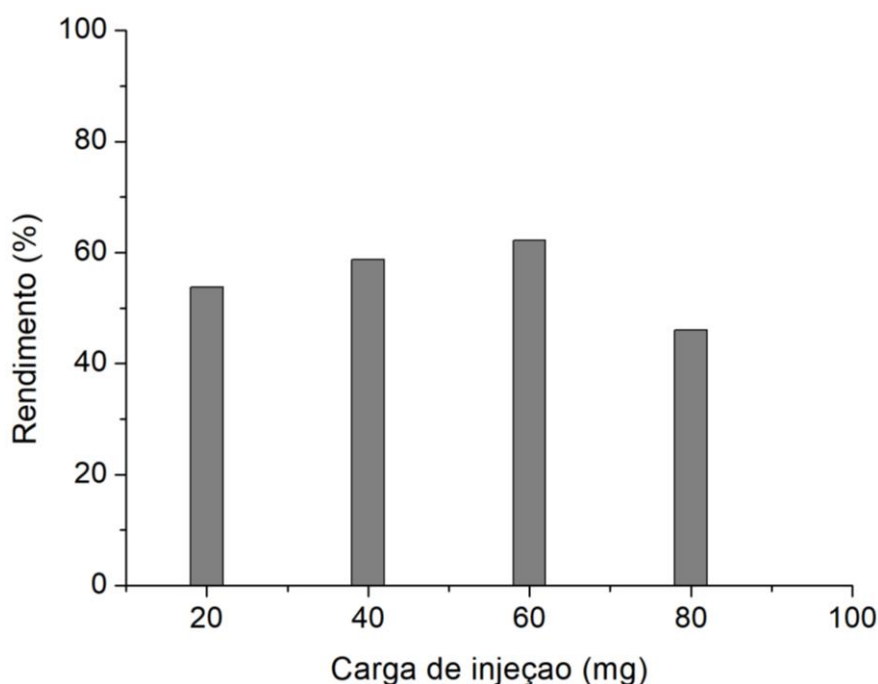
Tabela 8- Consumo de solvente e produtividade do fracionamento dos lipopeptídeos em diferentes cargas de injeção (20, 40, 60 e 80 mg) de extrato bruto de lipopeptídeos na escala semi-preparativa.

	<b>Carga de injeção</b>			
	<b>20 mg</b>	<b>40 mg</b>	<b>60 mg</b>	<b>80 mg</b>
<b>Consumo de Solvente (mL mg<sup>-1</sup>)</b>	3,49 ± 0,00	1,60 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,02 ± 0,01
<b>Produtividade (kg dia<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>)</b>	0,0012 ± 0,00	0,00264 ± 0,00	0,00408 ± 0,00	0,00408 ± 0,00

Fonte: Autor, 2019.

O rendimento total em massa para a escala semi-preparativa evidenciou que a ampliação de escala pode ser feita até a carga de 60 mg, pois a partir desse ponto ocorre um decréscimo do rendimento, corroborando com os resultados obtidos no consumo de solvente e na produtividade (Figura 11).

Figura 11- Rendimento total em massa na escala semi-preparativa.



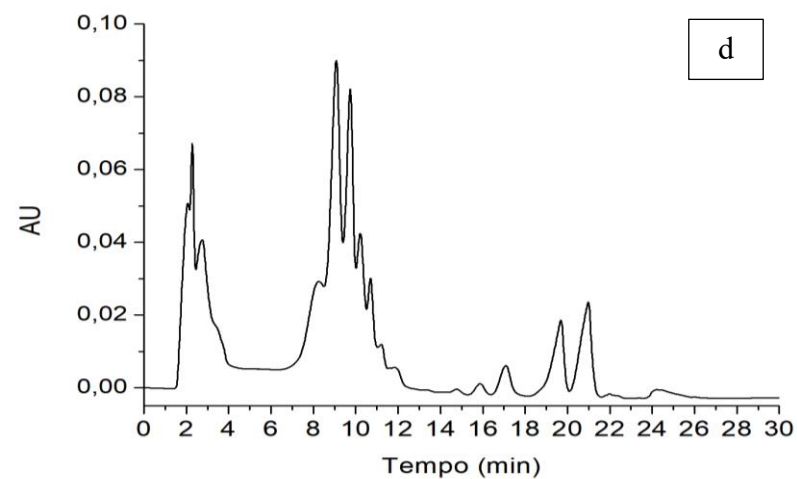
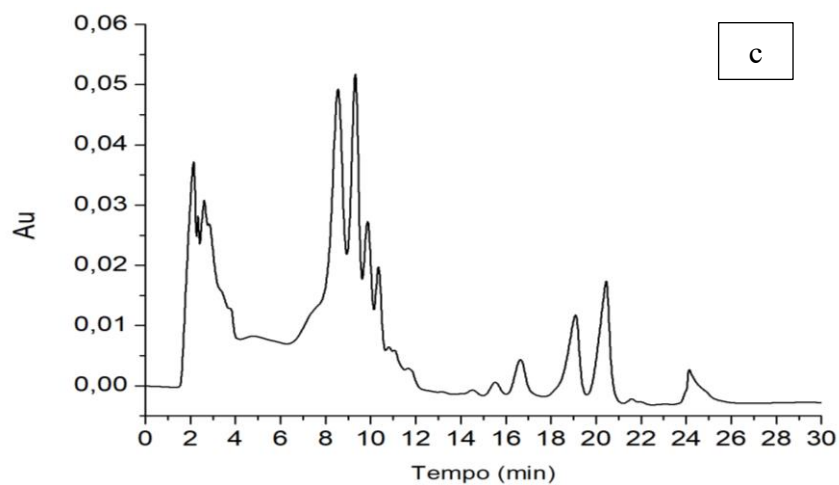
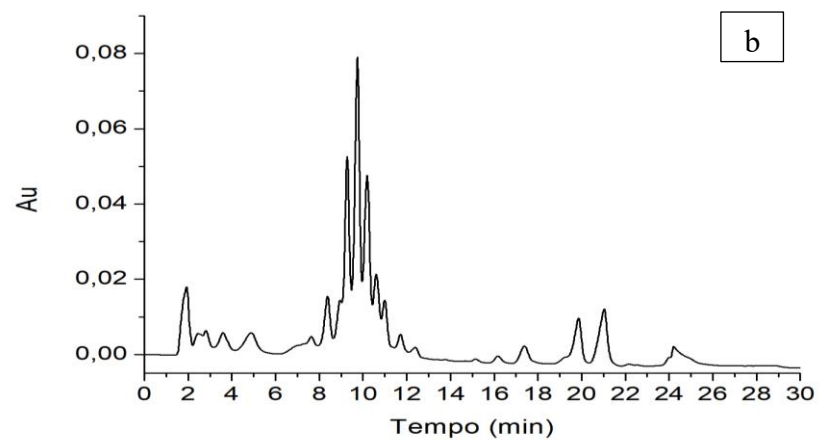
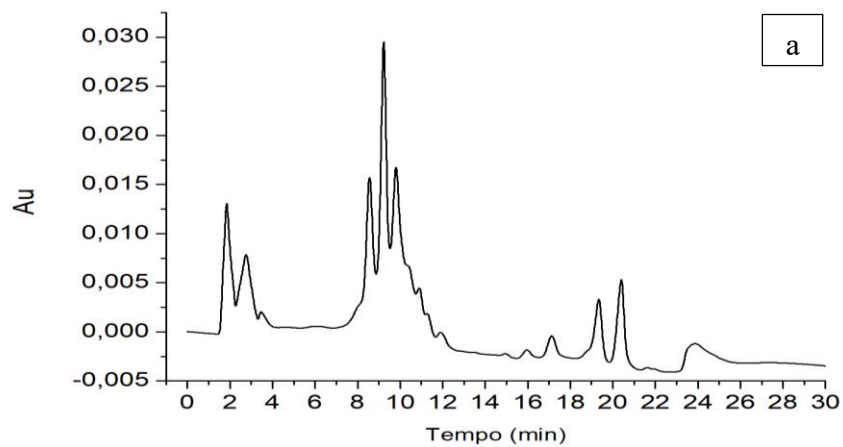
Fonte: Autor, 2019.

### Escala preparativa

A Figura 12 ilustra os cromatogramas obtidos na ampliação de escala para cada carga de injeção na escala preparativa. Comparando visualmente estes cromatogramas com os da escala semi-preparativa (Figura 10), nota-se que ocorreu um pequeno deslocamento nos tempos de retenção dos picos cromatográficos. Então, os tempos de coleta das frações, para cada família de lipopeptídeos na escala preparativa foram restabelecidos para 2-5 min para as iturinas, 7-14 para as fengicinas e 14,5-22 min para as surfactinas. As mesmas alterações dos perfis cromatográficos observadas na escala semi-preparativa foram visualizadas na escala preparativa (Figura 12 a, b, c e d), principalmente nos primeiros picos cromatográficos, correspondente a família de iturina. Contudo, não houve deslocamento no tempo de retenção com o aumento da carga injetada.



Figura 12-Cromatogramas da escala preparativa. (a) carga de injeção de 20 mg; (b) carga de injeção de 40 mg; (c) carga de injeção de 60 mg e (d) carga de injeção de 80 mg.



Fonte: Autor, 2019.

A tabela 9 ilustra os valores de consumo de solvente e produtividade para as diferentes cargas de injeção, na escala preparativa. Para o consumo de solvente os resultados obtidos foram 25, 11,92, 4,35 e 4,91 mL mg<sup>-1</sup>, para as cargas de 20, 40, 60 e 80 mg, respectivamente. Com relação a produtividade, os valores variaram de 0,00144 até 0,0084 kg dia<sup>-1</sup> por kg de adsorvente, para as cargas de 20, 40, 60 e 80 mg, respectivamente. Podemos visualizar que ocorreu um aumento da produtividade à medida que aumenta a cargas injetadas até a carga de 60 mg. Porém, na carga de 80 mg não ocorreu aumento de produtividade, corroborando com o resultado obtido na escala semi-preparativa e evidenciando que a ampliação da carga injeção pode ser feita até 60 mg.

Tabela 9- Consumo de solvente e produtividade do fracionamento dos lipopeptídeos em diferentes cargas de injeção (20, 40, 60 e 80 mg) de extrato bruto de lipopeptídeos na escala preparativa.

	<b>Carga de injeção</b>			
	<b>20 mg</b>	<b>40 mg</b>	<b>60 mg</b>	<b>80 mg</b>
<b>Consumo de Solvente (mL mg<sup>-1</sup>)</b>	25,01 ± 0,00	11,92 ± 0,00	4,35 ± 0,02	4,91 ± 0,00
<b>Produtividade (Kg dia<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>)</b>	0,00144 ± 0,00	0,00288 ± 0,00	0,0084 ± 0,02	0,00744 ± 0,00

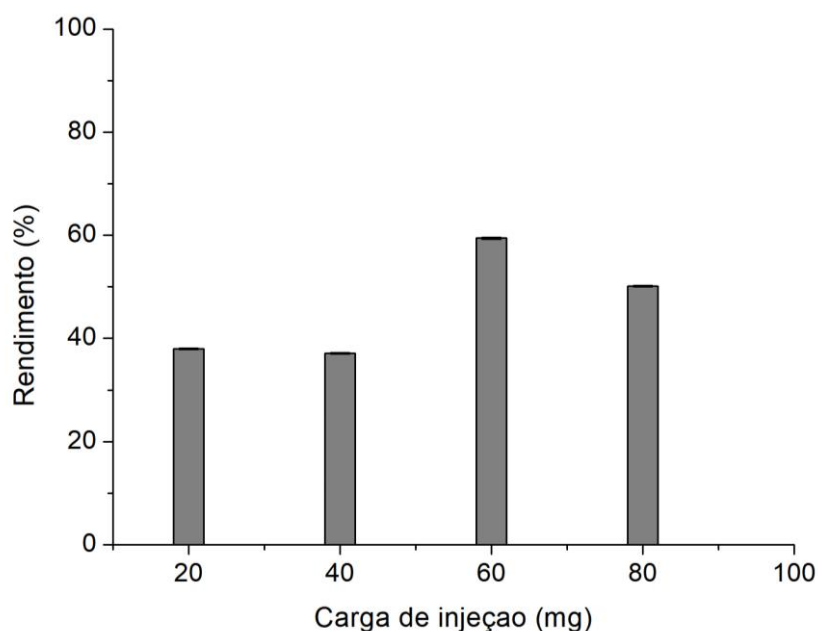
Fonte: Autor, 2019.

Traçando um paralelo dos resultados obtidos entre a escala semi-preparativa e preparativa, nota-se que na escala preparativa o consumo de solvente foi 4 vezes maior quando comparado ao da escala semi-preparativa, porém sua produtividade foi 2 vezes maior, para a carga de 60 mg.

Para avaliarmos qual tipo de escala será a mais vantajosa faz-se necessário ponderar duas vertentes: primeiro, se o foco da indústria for produtividade independente do gasto com solvente a escala preparativa é a mais adequada. A segunda vertente seria que se o processo estabelecer diretrizes da química verde, na qual uma das premissas é diminuir o consumo de solventes orgânicos no processo, a escala semi-preparativa é a mais indicada. Contudo, em um mundo cada vez mais consciente com o meio ambiente e também cada vez mais focado na produtividade deve-se ter alternativas para atender ambas as necessidades, assim uma possibilidade para tal processo seria o reuso dos solventes utilizados no processo, o que proporcionaria um ganho significativo tanto para o meio ambiente como para a econômica do processo de separação desses compostos.

O resultado do rendimento total em massa para a escala preparativa também evidenciou que a ampliação de escala pode ser feita até a carga de 60 mg, pois a partir desse ponto ocorre um decréscimo de rendimento, corroborando com os resultados obtidos no consumo de solvente e na produtividade (Figura 13).

Figura 13-Rendimento total em massa na escala preparativa.



Fonte: Autor, 2019.

### Partição Líquido-Líquido

Os testes preliminares das proporções de solventes mostraram resultados relevantes, pois apresentaram outra alternativa para a separação das famílias de lipopeptídeos, que foi a possibilidade de utilizar a cromatografia em contracorrente para o fracionamento dos lipopeptídeos, já que a proporção 1: 9: 3: 7 (v/v/v/v) de n-hexano, acetato de etila, metanol e água, mostrou-se ideal para separar iturinas de fengicinas (Tabela 10) e a proporção de 5: 5: 5: 5 (v/v/v/v) de n-hexano, acetato de etila, metanol e água, foi a mais adequada para a separação de surfactinas (Tabela 11), pois essas proporções apresentaram o valor de K próximos de 1. Sabe-se que quanto mais próximo o valor de K ficar de 1 melhor será o processo de separação por CCC (BRUNNER, 2009; COSTA et al., 2015; LIANG et al., 2015; SHIBUSAWA et al., 2006; WANG et al., 2011; YANAGIDA et al., 2007; YIN et al., 2013).

Tabela 10-Valor de k para a razão de (1:9:3:7) (v/v/v/v) de n-hexano, acetato de etila, metanol e água.

<b>Compostos</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>[M-H]<sup>+</sup></b>	<b>Fragmentos</b>	<b>Valor de K</b>
Iturina A2	7.19	1043.5588	299/638/801/915	0,2731
Iturina A3-A5	7.83	1057.5729	-	0,5822
Iturina A6-A7	7.86	1071.5889	212/666/829	0,6449
Fengicina A	8.32	1435.7742	966/1080	0,0727
Fengicina A	9.08	1449.7961	966/1080	0,1081
Fengicina B	9.41	1477.8228	994/1180	0,7967
Fengicina A	9.95	1463.8141	966/1080	0,2259
Fengicina B	10.29	1491.8446	994/1180	0,7004
Fengicina B	10.62	1505.8540	994/1180	1,1138

Fonte: Autor, 2019.

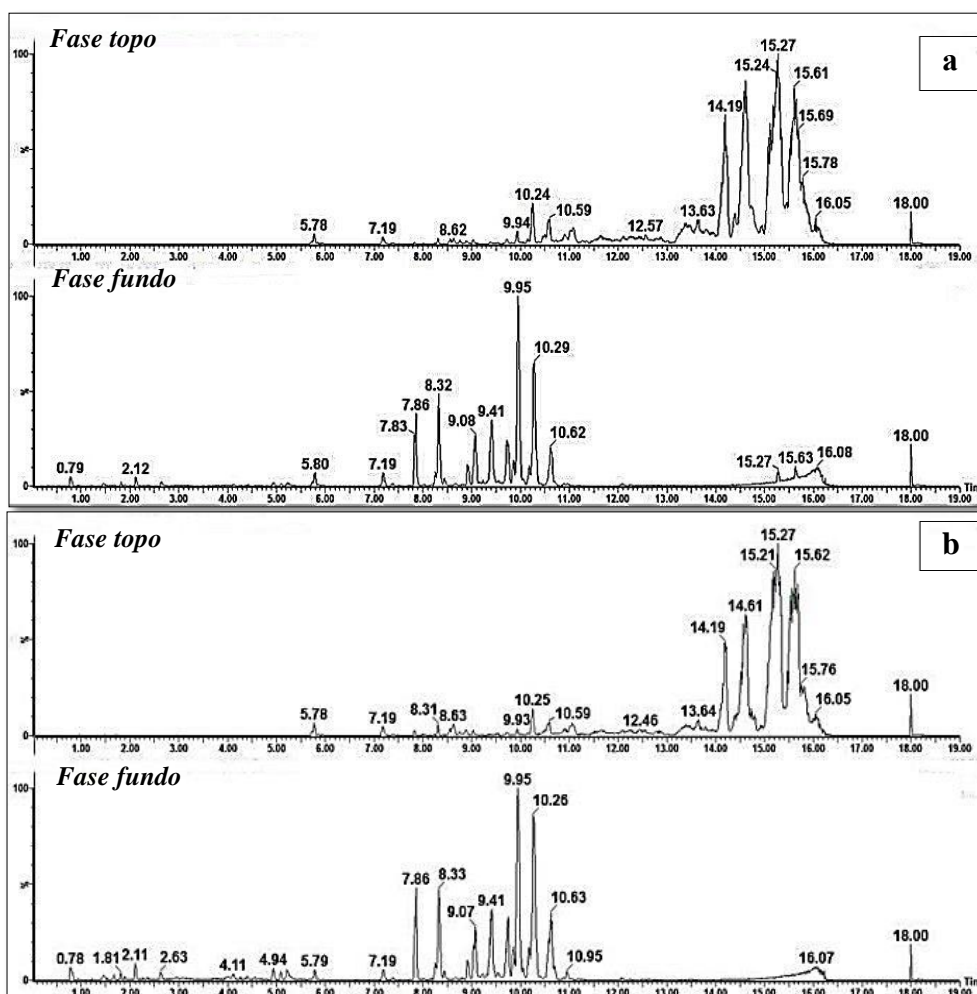
Tabela 11-Valor de k para a razão de (5:5:5:5) (v/v/v/v) de n-hexano, acetato de etila, metanol e água.

<b>Compostos</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>[M-H]<sup>+</sup></b>	<b>Fragmentos</b>	<b>Valor de K</b>
Surfactina	14.19	994.6481	-	1,6452
Surfactina	14.62	1008.6709	455/667/895	2,1608
Surfactina	15.26	1022.6839	355/582/796/909	2,9309
Surfactina	15.63	1036.6935	441/685/923	3,2209
Surfactina	15.14	1044.6576	-	1,3186

Fonte: Autor, 2019.

Outro resultado interessante foi obtido com as proporções (2: 8: 2: 8) e (2: 8: 3: 7) (v/v/v/v) de n-hexano, acetato de etila, metanol e água, pois se o objetivo for separar apenas a surfactina, uma simples partição líquido-líquido pode ser realizada, pois a família de surfactina foi totalmente para a fase topo (Figura 14), proporcionando uma economia no processo de obtenção desta família, pois não necessitará de equipamentos e nem colunas cromatográficas para que o processo de separação ocorra. O rendimento obtido para cada fase particionada na proporção 2:8:2:8 (v/v/v/v) de n-hexano, acetato de etila, metanol e água, foi de 52% para a fase fundo, que compreende as famílias de iturina e fengicina e de 26% para a fase topo, que corresponde a família de surfactina (Figura 14 A).

Figura 14- Cromatogramas UPLC-QToF- MS<sup>E</sup> da partição líquido-líquido. (a) sistema de solventes na proporção 2:8:2:8 (v/v/v/v) de n-hexano, acetato de etila, metanol e água e (b) sistema de solventes na proporção 2:8:3:7 (v/v/v/v) de n-hexano, acetato de etila, metanol e água.



Fonte: Autor, 2019.

Uma explicação para a migração da surfactina para a fase topo é que os biosurfactantes, de um modo geral, possuem um caráter anfifílico, devido a sua estrutura possuir uma parte hidrofílica, correspondendo ao ciclo de peptídeos e uma porção hidrofóbica de cadeias de hidrocarbonetos insaturados ou saturados ou ácidos graxos. A solubilidade de cada família de lipopeptídeo está relacionada ao tamanho da cadeia de hidrocarbonetos (grupo hidrofóbico), que pode variar de C<sub>13</sub> a C<sub>16</sub> para a surfactina, de C<sub>14</sub> a C<sub>17</sub> para a iturina e de C<sub>14</sub> a C<sub>18</sub>, no caso da fengicina; e também do tamanho do ciclo de peptídeos (grupo hidrofílico), tornando a família de lipopeptídeo menos ou mais solúvel na fração polar, respectivamente (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010; LORENA DE OLIVEIRA; SANDRA DE CÁSSIA, 2017; VALPUESTA, 2008a). Essa característica associada a força de partição que o n-hexano e o acetato de etila (fase topo) na proporção 2:8 (v/v), respectivamente, fez com que ocorresse a migração da surfactina para a fase topo.

### **HPLC associado com a partição líquido-líquido**

A partir desses resultados iniciais, observa-se que se o interesse for obter as três famílias de lipopeptídeos separadas, pode-se realizar a associação das duas técnicas de separação (HPLC e partição líquido-líquido), ou seja, inicialmente pode-se realizar a partição líquido-líquido, para obter a surfactina isolada e consecutivamente realizar a HPLC para separar as iturinas das fengicinas. Com isso têm-se a possibilidade de diminuir tanto o tempo do processo de separação como também o volume de solvente gasto, pois a corrida cromatográfica pode ser reduzida, entretanto, faz-se necessário analisar se essa economia de tempo e solvente trará vantagens para o processo de fracionamento dos lipopeptídeos.

Analisando o tempo gasto no fracionamento por HPLC, temos que em uma corrida convencional o tempo necessário para fracionar as três famílias é de 30 min, com a associação, este tempo passaria a ser de apenas 16 min, que é o tempo necessário para fracionar as iturinas das fengicinas, como foi visto na Figura 9. Entretanto, é necessário levar em consideração o tempo gasto com o equilíbrio da coluna, que no gradiente utilizado corresponde a um tempo de 10 min, portanto, o tempo total gasto para separar as iturinas das fengicinas seria de 26 min, tendo assim uma economia de tempo de apenas 4 min. A diferença pode parecer pequena, entretanto, se considerarmos uma produção contínua de 24h, teremos um ganho de tempo equivalente para realizar mais sete corridas

cromatográficas, o que fornecerá uma maior produtividade na separação desses compostos.

Analisando agora o volume total de solvente orgânico gasto na HPLC, temos que em uma corrida convencional na escala semi-preparativa utiliza-se 75,32 mL e na escala preparativa usa-se 188,3 mL (Tabela 12).

Tabela 12- Quantidade de solvente utilizado no HPLC.

Tempo (min)	Gradiente de eluição (%)	Volume parcial de solvente orgânico gasto na escala Semi-preparativa (mL)	Volume parcial de solvente orgânico gasto na escala preparativa (mL)
0-3	45	5,4	13,5
3-8	50	10	25
8-15	80	22,4	56
15-16	88	3,52	8,8
16-20	100	16	40
20-30	45	18	45
<b>Total de solvente gasto</b>		75,32	188,3

Fonte: Autor, 2019.

Para totalizar o volume de solvente gasto com a associação das duas técnicas, faz-se necessário analisarmos também o volume de solvente gasto na partição líquido-líquido, que no caso são utilizados 24, 48, 96 e 192 ml de solvente orgânico para particionar 20, 40, 60 e 80 mg de extrato bruto, respectivamente (Tabela 13).

Tabela 13- Quantidade de solvente orgânico utilizado na partição líquido-líquido para a proporção 2:8:2:8 (v/v/v/v).

Amostra (mg)	N-hexano (mL)	Acetato de Etila (mL)	Metanol (mL)	Água (mL)	Total de solvente orgânico (mL)
20	4	16	4	16	24
40	8	32	8	32	48
60	16	64	16	64	96
80	32	128	32	128	192

Fonte: Autor, 2019.

Para estimar volume de solvente gasto com a associação, deve-se realizar o somatório dos volumes parciais correspondentes a cada faixa de gradiente utilizado no fracionamento por HPLC, somente, das iturinas e das fengicinas, que no caso corresponde aos intervalos de tempo de 0-3 min; 3-8 min; 8-15 min e 15-16 min (Tabela 12), assim o volume total gasto na escala semi-preparativa é de 41,32 mL e para a escala preparativa é de 103,3 mL, entretanto, também deve-se levar em consideração o volume de solvente

gasto com o equilíbrio da coluna, objetivando iniciar uma nova corrida cromatográfica, que no caso compreende a faixa de tempo de 20-30 min, assim na escala semi-preparativa esse volume gasto com o equilíbrio é de 18 mL e para a escala preparativa é de 45 mL. Portanto, o volume total de solvente orgânico gasto na escala semi-preparativa é de 59,32 mL e para a escala preparativa é de 148,3 mL (Tabela 14).

Realizando o somatório do volume de solvente gasto em ambas as técnicas, temos que para a escala semi-preparativa e particionado 20 mg do extrato, o volume total de solvente gasto foi de 83,32 mL (Tabela 14), ocasionando uma utilização de 8 mL a mais de solvente quando comparado a uma corrida convencional na escala semi-preparativa, que foi de 75,32 mL, portanto, a associação das técnicas em escala semi-preparativa não fornece redução de solvente no processo.

Em contrapartida, se analisarmos a escala preparativa a junção das duas técnicas torna-se mais viável particionando 20 mg do extrato, pois o volume total de solvente gasto seria de 172,3 mL (Tabela 14), tendo assim uma economia de 16 mL. Se levarmos em consideração uma produção contínua de 24 h, teremos uma economia de solvente equivalente para realizar mais cinco corridas cromatográficas, o que torna economicamente vantajoso se trabalhar com a associação das duas técnicas na escala preparativa. Se aumentarmos a massa particionada para 40 ou 60 mg não ocorrerá economia de solvente, como pode-se visualizar na Tabela 14. Portanto, se o objetivo for trabalhar com essas massas (40 e 60 mg) é mais viável se trabalhar somente com a técnica de HPLC.



Tabela 14- Economia total de solvente com a associação da HPLC com a partição líquido-líquido.

Escala	Massa particionada* (mg)	Partição** (mL)	HPLC na associação*** (mL)	HPLC + partição**** (mL)	HPLC convencional***** (mL)	Gasto a mais de solvente (mL)	Total de economia (mL)
<b>Semi-preparativa</b>	20	24	59,32	83,32	75,32	8	0
<b>Preparativa</b>	20	24	148,3	172,3	188,3	0	16
<b>Semi-preparativa</b>	40	48	59,32	107,32	75,32	32	0
<b>Preparativa</b>	40	48	148,3	196,3	188,3	8	0
<b>Semi-preparativa</b>	60	96	59,32	155,32	75,32	80	0
<b>preparativa</b>	60	96	148,3	244,3	188,3	56	0

\*Massa particionada: massa de extrato bruto particionado na partição líquido-líquido

\*\*Partição: Total de solvente gasto na partição líquido-líquido

\*\*\*HPLC na associação: Total de solvente gasto com HPLC na associação das técnicas

\*\*\*\*HPLC + partição: Somatório do volume de solvente gasto com as duas técnicas

\*\*\*\*\* HPLC convencional: Total de solvente gasto em uma corrida convencional com HPLC

Fonte: Autor, 2019.

## CONCLUSÃO

Através do presente estudo pode-se concluir a ampliação de escala de fracionamento dos lipopeptídeos pode ser realizada até a carga de injeção de 60 mg em ambas as escalas trabalhadas. Com relação aos parâmetros de desempenho a escala preparativa apresentou uma produtividade duas vezes maior comparada a escala semi-preparativa, entretanto, apresentou um consumo de solvente quatro vezes maior.

A associação da HPLC com a partição líquido-líquido é vantajosa quando se trabalha em escala preparativa, particionando inicialmente 20 mg, pois considerando uma produção contínua de 24 h, teremos uma economia de tempo suficiente para realizar mais sete corridas cromatográficas e também uma economia de solvente para realizar mais cinco corridas cromatográficas, o que pode tornar o processo mais produtivo, e conseqüentemente, alavancando o processo de fracionamento das famílias de lipopeptídeos.

### 4.3 Potencial antifúngico de famílias de lipopeptídeos produzidos pelo *B. Subtilis* CNPMS 22

#### RESUMO

A busca por produtos naturais com capacidade de controlar fitopatógenos é uma necessidade crescente devido à preocupação tanto com a segurança alimentar quanto como o meio ambiente. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade fungicida das famílias de lipopeptídeos produzidos pelo *Bacillus subtilis* CNPMS 22 contra *Fusarium pallidoroseum* (agente da fusariose), *Colletotrichum musae* (agente da antracnose) e o *Lasiodiplodia caatigensis* (agente da resinose), bem como verificar a concentração inibitória mínima e a citotoxicidade dos lipopeptídeos. Inicialmente as famílias de lipopeptídeos foram produzidas por fermentação e a extração foi realizada por precipitação ácida. As famílias de lipopeptídeos foram identificadas por espectrometria de massas, que revelou a presença de três famílias de lipopeptídeos: iturinas, fengicinas e surfactinas. O fracionamento das famílias foi realizado por cromatografia líquida. As frações e o extrato bruto foram avaliadas através de testes de atividade antifúngica com a metodologia de difusão em meio de cultura. Foi utilizado como controle negativo água e como controle positivo um fungicida comercial. O teste de atividade antifúngica revelou que a família de fengicina pode ser utilizada como um defensivo agrícola natural contra o *Fusarium pallidoroseum*, pois apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) de apenas 0,0002 mg mL<sup>-1</sup>. Já para o *Colletotrichum musae*, a família de surfactina se destacou, apresentando uma CIM de 0,0003 mg mL<sup>-1</sup>. Para o *Lasiodiplodia caatigensis* nem as frações, o extrato bruto e nem o controle positivo foi capaz de ocasionar a inibição do crescimento. A análise de citotoxicidade revelou que os lipopeptídeos e o extrato bruto possuem baixa citotoxicidade, indicando que podem ser utilizados como um agente antifúngico sem ocasionar danos à saúde humana. Diante dos resultados pode-se concluir que o *Bacillus subtilis* CNPMS 22 é um microrganismo que fornece um bio-recurso alternativo para o controle de fitopatógenos, principalmente para as famílias de fengicina e surfactina, uma vez que apresentaram baixa CIM, revelando o grande potencial de inibição do crescimento fúngico para a linhagem de *Fusarium pallidoroseum* e *Colletotrichum musae*.

**Palavras-chaves:** CIM; fitopatógenos; inibição.

#### INTRODUÇÃO

Durante muitos anos, os fungicidas químicos têm sido utilizados em grande escala como meio profilático no controle de fitopatógenos. Embora o emprego dessas substâncias tenha contribuído para o crescimento da produção agrícola, também trouxe muitos malefícios, devido a sua aplicação incorreta e indiscriminada, que ocasionam a

contaminação do solo, contaminação da água, aparecimento de patógenos resistentes, intoxicação de produtores rurais e acúmulo de substâncias tóxicas em alimentos (ACCINELLI et al., 2014; BRAVO et al., 2011; CHINTKUNTLA, 2015). Contudo, a busca por produtos naturais com capacidade de controlar fitopatógenos é uma necessidade crescente devido à preocupação tanto pela segurança alimentar quanto pelo meio ambiente. Nesse contexto, microrganismos podem produzir metabólitos secundários que são potenciais agentes de controle biológico, destacando-se o *Bacillus subtilis* como uma das bactérias mais amplamente utilizadas no controle de fitopatógenos, devido ao seu potencial para produzir uma grande variedade de lipopeptídeos com atividade antifúngica (MEENA; KANWAR, 2015; PATHAK et al., 2012).

Lipopeptídeos são um grupo de surfactantes que possuem em sua estrutura básica uma cadeia de peptídeos ligados a ácidos graxos. As famílias de lipopeptídeos mais comuns são: Iturina, fengicina e surfactina (DHANARAJAN; RANGARAJAN; SEN, 2015; JACQUES, 2011). Os lipopeptídeos são substâncias cíclicas de sete ou dez  $\alpha$ -aminoácidos ligados a uma cadeia de ácidos graxos que podem variar de C<sub>13</sub> a C<sub>16</sub> para a surfactina, de C<sub>14</sub> a C<sub>17</sub> para a iturina e de C<sub>14</sub> a C<sub>18</sub>, no caso da fengicina. (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010). O número de átomos de carbono na composição dos aminoácidos da parte peptídica divide os lipopeptídeos em isoformas. As isoformas podem ainda ser subdivididas em séries homólogas, que diferem no número de átomos de carbono que compõem a cadeia alifática (BEHARY et al., 2012; JACQUES, 2011).

Os lipopeptídeos apresentam muitas aplicações, como por exemplo, as iturinas atuam como agentes no controle biológico, apresentando um espectro de ação contra vários tipos de fungos fitopatogênicos, principalmente contra os fungos filamentosos (KAWAGOE et al., 2015). Fengicina atua no controle de doenças em plantas, exibindo ação antifúngica, especificamente contra fungos filamentosos (RANGARAJAN; DHANARAJAN; SEN, 2015). Surfactina que é o principal representante da família dos lipopeptídeos, apresentando ação antibiótica, antitumoral, antiviral e inibidora de toxinas (MEENA; KANWAR, 2015).

A verificação do potencial fungicida dessas famílias de lipopeptídeos contra patógenos, especialmente aqueles que causam perdas de produtividade, principalmente nas culturas de melão e caju é de extrema relevância, uma vez que, são cultivares que se destacam dentro do agronegócio brasileiro. Em especial, as culturas de banana, melão e caju se destacam dentro do agronegócio brasileiro. Segundo a FAO (2019), foram

produzidos no Brasil cerca de 6,6 milhões de toneladas de banana, 540 milhões de toneladas de melão e 1 milhão de toneladas de caju em 2017. Essas cultivares são de extrema importância econômica para a região

Alguns fitopatógenos que normalmente atacam as culturas de banana, melão e caju são: *Fusarium pallidoroseum*, que é o agente de podridão pós-colheita, *Colletotrichum musae*, que é o agente da antracnose e o *Lasiodiplodia caatingensis*, que é o agente de resinose. Contudo, a utilização de fungicidas alternativos trazem a possibilidade de oferecer à população alimentos saudáveis e livres de defensivos químicos, o que será benéfico para a população e para o meio ambiente. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade fungicida das famílias de lipopeptídeos produzidos pelo *Bacillus subtilis* CNPMS 22 contra *Colletotrichum musae* (agente da antracnose), *Fusarium pallidoroseum* (agente da fusariose) e o *Lasiodiplodia caatingensis* (agente da resinose), bem como verificar a concentração inibitória mínima e a citotoxicidade dos lipopeptídeos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Reagentes

Os reagentes utilizados foram metanol P.A. (pureza  $\geq 99,8\%$ ), adquirida à Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA); acetonitrila HPLC (pureza 99,9%) foi obtido de Tedia (Fairfield, OH, EUA) e água purificada de um sistema Millipore Advantage A10 (Molsheim, França).

### Produção dos lipopeptídeos

Os lipopeptídeos foram produzidos pelo *Bacillus subtilis* CNPMS 22 (da coleção de microrganismos multifuncionais e fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo, código identificador BRM033307). A cepa foi cultivada em meio LB (lisogeny broth) sólido (triptona 10 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup> e ágar 15 g L<sup>-1</sup>) e incubado a 30 °C por 18 h. Para produzir o pré-inóculo, uma colônia isolada foi inoculada em 150 mL de meio líquido LB (triptona 10 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g L<sup>-1</sup> e NaCl 10 g L<sup>-1</sup>) e incubado a 30 °C sob agitação a 150 rpm por 18 h. Para a produção dos lipopeptídeos, 10 mL do pré-inóculo foram inoculados em erlenmeyer de 2 L, contendo 1 L de meio líquido LB com glicose (20 g L<sup>-1</sup> de glicose, 10 g L<sup>-1</sup> de triptona, 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e NaCl 10 g L<sup>-1</sup>, pH = 7) e incubou-se sob agitação a 150 rpm durante um período de 72 h a 30 °C. Após esse período, a biomassa foi removida por centrifugação (2671 g por 15 min). A extração dos metabólitos do caldo fermentado foi realizada por precipitação ácida, adicionando-se 6 M HCl para reduzir o pH para 2 e então armazenado no refrigerador por 24 horas. A suspensão foi centrifugada (3488 g durante 30 min) e o precipitado contendo os lipopeptídeos foi liofilizado. As condições do processo fermentativo, bem como do processo de extração dos compostos do caldo fermentado e a identificação dos compostos produzidos foram baseados no estudo realizado por (SOUZA et al., 2018).

## **Fracionamento das famílias de lipopeptídeos**

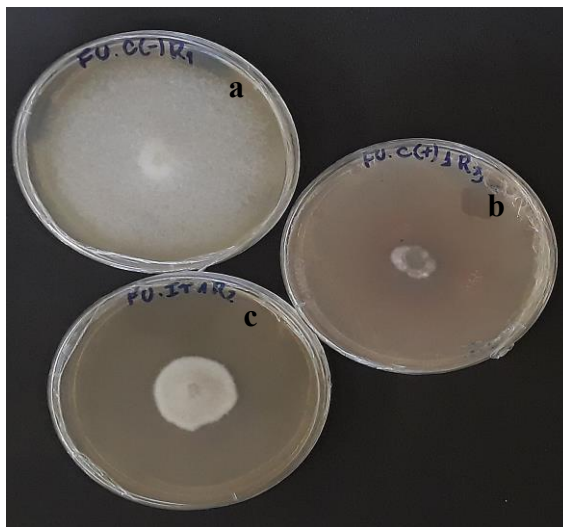
Inicialmente foram realizados testes de fracionamento das famílias em escala semi-preparativa, na qual os compostos foram separados utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC). O equipamento utilizado é munido de uma bomba (marca: Waters 2555 Quaternary Gradient Module); injetor manual (marca: Waters Preparative Chromatography rack); detector UV (marca: Waters 2489 UV/ visible Detector) e um coletor automático (Waters Fraction Collector III). Foi utilizada uma coluna C<sub>18</sub> semi-preparativa (250 mm x 10 mm; 10µm) (marca: Supelco; n° 12395-01). A separação das famílias de lipopeptídeos foi realizada seguindo o método proposto por YANG *et al.*, 2015 com adaptações. A fase móvel foi constituída de água (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados com 0,1% de ácido trifluoroacético e a composição do gradiente utilizada foi: 0-3 min, 55% (A); 3-8 min, 50% (A); 8-15.5 min, 20% (A); 15.5-16.5, 12% (A); 16.5-20 min, 0% (A); 20-30 min, 55% (A). O extrato foi solubilizado em metanol na concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup>, e posteriormente foi filtrado em filtro Millipore® de membrana de PTFE com poro de 0,22 µm. O volume de injeção foi de 400 µL. O fluxo utilizado foi de 4 ml min<sup>-1</sup> e o comprimento de onda utilizado foi de 205nm. Inicialmente foram feitos testes de tempos de coleta das frações, em que foi estabelecido os seguintes tempos de coleta: 2-8 min para as iturinas; 8,1-15,9 para as fengicinas e 16-22 min para as surfactinas. As frações obtidas foram evaporadas e liofilizadas. Os extratos liofilizados foram armazenados a -18°C.

## **Atividade antifúngica *in vitro***

Um teste preliminar foi realizado para verificar o potencial fungicida de cada família de lipopeptídeo isolada, bem como do extrato bruto. A metodologia utilizada foi a difusão em meio de cultura, na qual preparou-se uma solução de 10 mg mL<sup>-1</sup> da substância a ser testada, na qual foi solubilizada em água esteril. Desta solução retirou-se uma alíquota de 200 µL e colocou-se em 200 ml meio BDA, já autoclavado e em uma temperatura de aproximadamente de 40 °C, assim a concentração real final utilizada no teste foi de 10<sup>-2</sup> mg mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, o meio foi vertido em placas de Petri de 90

mm. Também foram avaliados grupos controles, como controle positivo foi utilizado o antifúngico comercial Tecto.SC, na qual a concentração real utilizada foi de  $10^{-4}$  mg mL<sup>-1</sup> e como controle negativo o meio BDA. As cepas de referência utilizadas no estudo foram fornecidas pelo laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical-Ceará-Brasil, cujo os códigos identificadores são: *Colletotrichum musae* (código identificador: LF 172), *Fusarium pallidoroseum* (código identificador: LF 139) e *Lasiodiplodia caatingensis* (código identificador: Bot.04). As linhagens foram ativadas em meio BDA (Batata-Dextrose-Agar), sob condições assépticas e posteriormente incubadas em estufa de crescimento (BOD) a uma temperatura de  $25 \pm 2$  °C, até que a colônia preenchesse a placa de Petri que é de 90 mm. As placas foram inoculadas com um disco de 5mm do respectivo fungo, vedadas e incubadas em BOD a 25°C. A análise dos resultados foi realizada por meio da medição do halo de crescimento a cada 24 h, com auxílio de paquímetro digital e comparado com os grupos controles. A zona de inibição foi calculada através da diferença do tamanho total da placa, que é de 90 mm, pelo halo total de crescimento. As medições foram encerradas quando o controle negativo atingiu o crescimento completo da placa de Petri (90mm) (Figura 15).

Figura 15-Ilustração do halo de crescimento do controle negativo (a), controle positivo (b) e da iturina (c) em 96 horas de experimento.



Fonte: Autor, 2019.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro repetições para cada composto isolado e para cada concentração; e para os grupos controle. Foi avaliado o efeito inibitório das amostras pela quantificação do tamanho dos halos de crescimento dos patógenos. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo a Equação 14, desenvolvida por (SIVAN; ELAD; CHET, 1984):

$$\% \text{ De inibição} = [1 - (F / C)] \times 100 \quad (14)$$

Em que, F é o diâmetro (mm) do halo de crescimento fúngico da amostra teste e o C é o diâmetro (mm) do halo do crescimento fúngico do controle negativo.

### **Concentração inibitória mínima**

Os testes da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração letal de 50% da colônia (CL<sub>50</sub>) foram realizados com os fungos: *Fusarium pallidoroseum* e o *Colletotrichum musae*. A CIM e a CL<sub>50</sub> foram determinadas usando análise PROBIT para avaliar a porcentagem de colônias fúngicas que não sobreviveram nas concentrações aplicadas do biofungicida (DJ, 1982). A CIM foi considerada a concentração que ocasiona 1% da inibição do crescimento fúngico e a CL<sub>50</sub> a concentração letal de 50% da colônia. Os ensaios de antibiograma foram realizados como descrito anteriormente como forma de padronizar as avaliações. Para a determinação da CIM e da CL<sub>50</sub>, as concentrações reais trabalhadas foram: 10<sup>-2</sup>; 5 10<sup>-3</sup>; 2,5 10<sup>-3</sup>; 1,25 10<sup>-3</sup>; 6,25 10<sup>-4</sup>; 3,125 10<sup>-4</sup> mg mL<sup>-1</sup>, para o extrato bruto e fengicina. E para a iturina e surfactina foram testadas as concentrações de 3 10<sup>-2</sup>; 2,5 10<sup>-2</sup>; 2 10<sup>-2</sup>; 1,5 10<sup>-2</sup>; 10<sup>-2</sup>; 5 10<sup>-3</sup> mg mL<sup>-1</sup>. Essa diferença das concentrações testadas entre as famílias de lipopeptídeos deve-se a dificuldade em encontrar uma faixa correta de diluição que fosse possível o PROBIT calcular a curva de probabilidades de dose resposta para o cálculo posterior da CIM.



## Citotoxicidade

As famílias de lipopeptídeos fracionadas, bem como o seu extrato bruto foram avaliados quanto a sua citotoxicidade. Inicialmente, as amostras foram diluídas em DMSO e testadas nas concentrações de estoque de 10 $\mu$ g/mL (substância isolada) e 100 $\mu$ g/mL (extrato bruto). As linhagens tumorais utilizadas: HCT-116 (cólón - humano), SNB-19 (Astrocitoma), HL60 (Leucêmica promielocítica). Para verificar seletividade utilizou-se a linhagem não tumoral L929 (Fibroblasto murinho). A linhagem L929 foi adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). As linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEM, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram plaqueadas nas concentrações de 0,7 x 10<sup>5</sup> (HCT-116 e L929), 0,1 x 10<sup>6</sup> (SNB-19) e 0,3 x 10<sup>6</sup> cels/mL para a linhagem HL60. As placas foram incubadas com a substância por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Ao término deste, as mesmas, foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150  $\mu$ L da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. Após a incubação as placas foram novamente centrifugadas para retirada da solução de MTT. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado de formazan com 150  $\mu$ L de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Os experimentos de concentração única foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão (DP) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa GraphPad Prism 5.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Potencial de atividade antifúngica

O resultado do teste preliminar evidenciou que dentre as amostras testadas contra o fungo *Fusarium pallidoroseum*, a fração de fengicina mostrou-se promissora no combate ao crescimento fúngico, pois obteve-se o menor halo de crescimento, cerca de 23 mm, zona de inibição de 66 mm e apresentou o maior percentual de inibição do crescimento fúngico, cerca de 73%, em 168 h de experimento (Tabela 15). Traçando um comparativo deste resultado com o fungicida comercial (controle positivo), nota-se que a diferença do percentual de inibição entre eles foi de apenas 10%, revelando que um produto natural como este, que é a fengicina, pode ser um substituto promissor para os defensivos químicos. O segundo melhor resultado obtido foi para o extrato bruto que apresentou um halo de crescimento de 39 mm, zona de inibição de 50 mm e percentual de inibição de 56%. Já a iturina apresentou um halo de crescimento de 45 mm e zona de inibição de 44 mm e percentual de inibição de 49%, e a surfactina igualou-se totalmente ao controle negativo, revelando que na concentração de  $10^{-2}$  mg mL<sup>-1</sup>, a mesma, não apresenta ação de inibição fúngica.

Tabela 15- Potencial de atividade antifúngica dos lipopeptídeos do pré-teste, na concentração real de  $10^{-2}$  mg mL<sup>-1</sup>, para os diferentes fitopatógenos testados.

Linhas	Amostras testadas	Halo de Crescimento (mm)	Zona de Inibição (mm)	Percentual de inibição (%)
<i>Fusarium pallidoroseum</i>	Extrato Bruto	39,40 ± 4,55	50,60	56,22
	Iturina	45,74 ± 0,56	44,26	49,18
	Fengicina	23,63 ± 2,43	66,37	73,74
	Surfactina	90,00 ± 0,00	0,00	0,00
	Controle Negativo	90,00 ± 0,00	0,00	0,00
	Controle Positivo	15,27 ± 1,99	74,73	83,03
<i>Colletotrichum musae</i>	Extrato Bruto	64,04 ± 1,02	25,96	28,84
	Iturina	66,00 ± 3,38	24,00	26,67
	Fengicina	51,68 ± 2,86	38,32	42,58
	Surfactina	56,37 ± 1,23	33,63	37,37
	Controle Negativo	90,00 ± 0,00	0,00	0,00
	Controle Positivo	5,00 ± 0,00	85,00	94,44
<i>Lasiodiplodia caatingensis</i>	Extrato Bruto	90,00	-	-
	Iturina	90,00	-	-
	Fengicina	90,00	-	-
	Surfactina	90,00	-	-
	Controle Negativo	90,00	-	-
	Controle Positivo	90,00	-	-

Fonte: Autor, 2019.

No estudo de CHEN et al., 2010, as fengicinas A ( $m/z$  1464.1 e 1478.1) produzidas pelo *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B1, obtiveram ação contra o *F. oxysporum f. sp. cucumis melo L.*, na qual apresentou uma zona de inibição de 18 mm, para a concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>. Se traçarmos um comparativo entre essa pesquisa com o presente trabalho, nota-se que a zona de inibição obtida pela família de fengicinas produzidas pelo *B. subtilis* CNPMS 22 foi de aproximadamente 3,6 vezes maior.

Já nos experimentos de ZOUARI et al., 2016, o extrato bruto de lipopeptídeo produzidos pelo *Bacillus amyloliquefaciens* CEIZ-11, obteve forte ação contra a espécie de *F. oxysporum*, apresentando uma zona de inibição de 17 mm. Comparando este valor com o extrato bruto obtido no presente estudo, observa-se que o extrato bruto produzido pelo *B. subtilis* CNPMS 22 obteve uma zona de inibição, de aproximadamente, 2,9 vezes maior. Essas pesquisas corroboram com o presente estudo e mostram o potencial tanto das famílias de lipopeptídeos isoladas como do extrato bruto produzidos pelos *Bacillus*.

Com relação ao fungo *Colletotrichum musae*, a família de fengicina se destacou dentre os demais lipopeptídeos testados, apresentando o menor halo de crescimento, cerca de 51 mm e zona de inibição de 38 mm, e conseqüentemente o maior percentual de inibição, cerca de 42%. Alguns estudos já abordam a ação dos lipopeptídeos no combate ao fungo *Colletotrichum*, como por exemplo, nos estudos de YÁNEZ-MENDIZÁBAL; FALCONÍ, 2018, em que o caldo fermentado pelo *Bacillus* CtpxZ3 apresentou uma inibição de 68 %. Outro estudo relata que o *B. subtilis* EA-CB0015 foi testado contra o *Colletotrichum acutatum* EA-HP012, e apresentou uma inibição de somente 23% quando se trabalhou com o caldo fermentado livre de células e de 64 % quando utilizou-se o próprio *B. subtilis* EA-CB0015 como antagonista do fungo (ARROYAVE-TORO; MOSQUERA; VILLEGAS-ESCOBAR, 2017). Essas pesquisas corroboram com o presente estudo e mostram que o percentual de inibição obtido foi equivalente ao encontrado quando se utilizou a família de fengicina.

Para o fungo *Lasiodiplodia caatingensis* nenhum das famílias de lipopeptídeos testadas e nem o controle positivo, apresentou ação de inibição do crescimento fúngico, igualando-se totalmente ao controle negativo. Na bula do fungicida comercial consta que o mesmo, só inibe o crescimento do *Lasiodiplodia theobromae* na concentração de 1 mL L<sup>-1</sup> de água.

A espécie de *Lasiodiplodia* devido a facilidade de disseminação de seus esporos que normalmente é realizada pelo vento, água, sementes, insetos, animais e instrumentos

agrícolas é uma espécie difícil de a ser combatida (SAJITHA; DEV, 2016; YUAN et al., 2012). Na literatura só foi encontrado, até o presente momento, duas pesquisas que abordam a atividade dos lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* contra a o *Lasiodiplodia theobromae* (SAJITHA; DEV, 2016; YUAN et al., 2012). Não havendo estudos sobre o *Lasiodiplodia caatingensis*.

Diante destes resultados preliminares nota-se que os lipopeptídeos produzidos pelo *B. subtilis* CNPMS 22 possuem atividade fungicida contra os fungos: *Fusarium pallidoroseum* e o *Colletotrichum musae*, assim foi realizado um estudo para determinar a CIM e a CL<sub>50</sub>.

### Concentração inibitória mínima

#### *Fusarium pallidoroseum*

Analisando os resultados obtidos da CIM, nota-se que para ocasionar 1% da inibição do crescimento do *Fusarium pallidoroseum* é necessário, apenas, uma concentração de 0,0002 mg mL<sup>-1</sup> da família de fengicina (Tabela 16). Essa concentração é relativamente baixa quando comparada as outras famílias de lipopeptídeos testadas e do seu extrato bruto, revelando o potencial da família de fengicina frente a este fitopatógeno, o mesmo fato foi observado nos resultados obtidos na CL<sub>50</sub>.

Tabela 16- CIM e CL<sub>50</sub> das famílias de lipopeptídeos contra os fungos: *Fusarium pallidoroseum* e *Colletotrichum muase*.

Fungos	Amostras	CIM (mg mL <sup>-1</sup> )	CL <sub>50</sub>
<i>Fusarium pallidoroseum</i>	Extrato Bruto	0,4205 ± 0,1618	10,1181 ± 2,1293
	Iturina	0,0298 ± 0,0219	8,4147 ± 0,7505
	Fengicina	0,0002 ± 0,0005	1,4284 ± 0,2516
	Surfactina	7,1201 ± 3,6991	36,4495 ± 9,8494
<i>Colletotrichum musae</i>	Extrato Bruto	-	-
	Iturina	0,0335 ± 0,2203	8,6272 ± 3,1918
	Fengicina	-	-
	Surfactina	0,0003 ± 0,013	322,3418 ± 274,4913

Fonte: Autor, 2019.

Comparado este resultado da família de fengicina com os experimentos de MNIF et al., 2015, em que testaram os lipopeptídeos produzidos pelo *Bacillus subtilis* SPB1 contra o fungo *Fusarium solani* e encontraram uma CIM de 3 mg mL<sup>-1</sup>, pode-se observar que foi necessário uma concentração 10.000 vezes maior quando comparado ao do presente estudo. Revelando que a família de fengicina produzida pelo *B. subtilis* CNPMS 22 é um bio-recurso ideal para ser utilizada como um antifúngico natural.

A família de iturina apresentou o segundo melhor resultado, apresentando uma CIM de 0,0298 mg mL<sup>-1</sup>. Entretanto, pode-se observar que foi necessária uma concentração 149 vezes maior quando comparada a da família de fengicina.

O extrato bruto necessitou de uma concentração mais elevada para ocasionar a inibição de 1% do crescimento fúngico, quando comparada a fengicina e a iturina, indicando que a sinergia entre os lipopeptídeos não forneceu benefícios para potencializar a inibição do crescimento fúngico do *Fusarium pallidoroseum*. Uma explicação para este fato é com relação a concentração que cada família se encontra no extrato bruto, ou seja, como foi visto a fengicina e iturina apresentam uma forte ação de inibição em baixas concentrações, assim se essas famílias estiverem em maior concentração no extrato bruto, consequentemente teremos uma ação mais eficiente de inibição neste extrato. De acordo com Souza et al., (2018), o extrato bruto produzido pelo *B. subtilis* CNPMS 22, produz uma maior concentração de surfactina e fengicina, assim a substância responsável pela atividade antifúngica do extrato bruto provem da fengicina, uma vez que, a surfactina necessitou de uma concentração alta para ocasionar a inibição do crescimento fúngico.

#### *Colletotrichum musae*

Para o fungo *Colletotrichum musae* não foi possível determinar a CIM do extrato bruto e nem da fengicina, pois a análise estatística PROBIT não conseguiu calcular a curva de probabilidades de dose resposta com os dados experimentais obtidos, pois nas diluições trabalhadas a média dos halos de crescimento ficaram muito próximas entre si (Figura 16), assim para calcular a CIM para o extrato bruto e a família de fengicina deve-se trabalhar em outra faixa de diluição.

A análise PROBIT conseguiu prever a CIM da família de iturina e da surfactina. Comparando as CIM dessas duas famílias, nota-se que a família de surfactina apresentou uma CIM significativa, necessitando de apenas 0,0003 mg mL<sup>-1</sup> para ocasionar a inibição

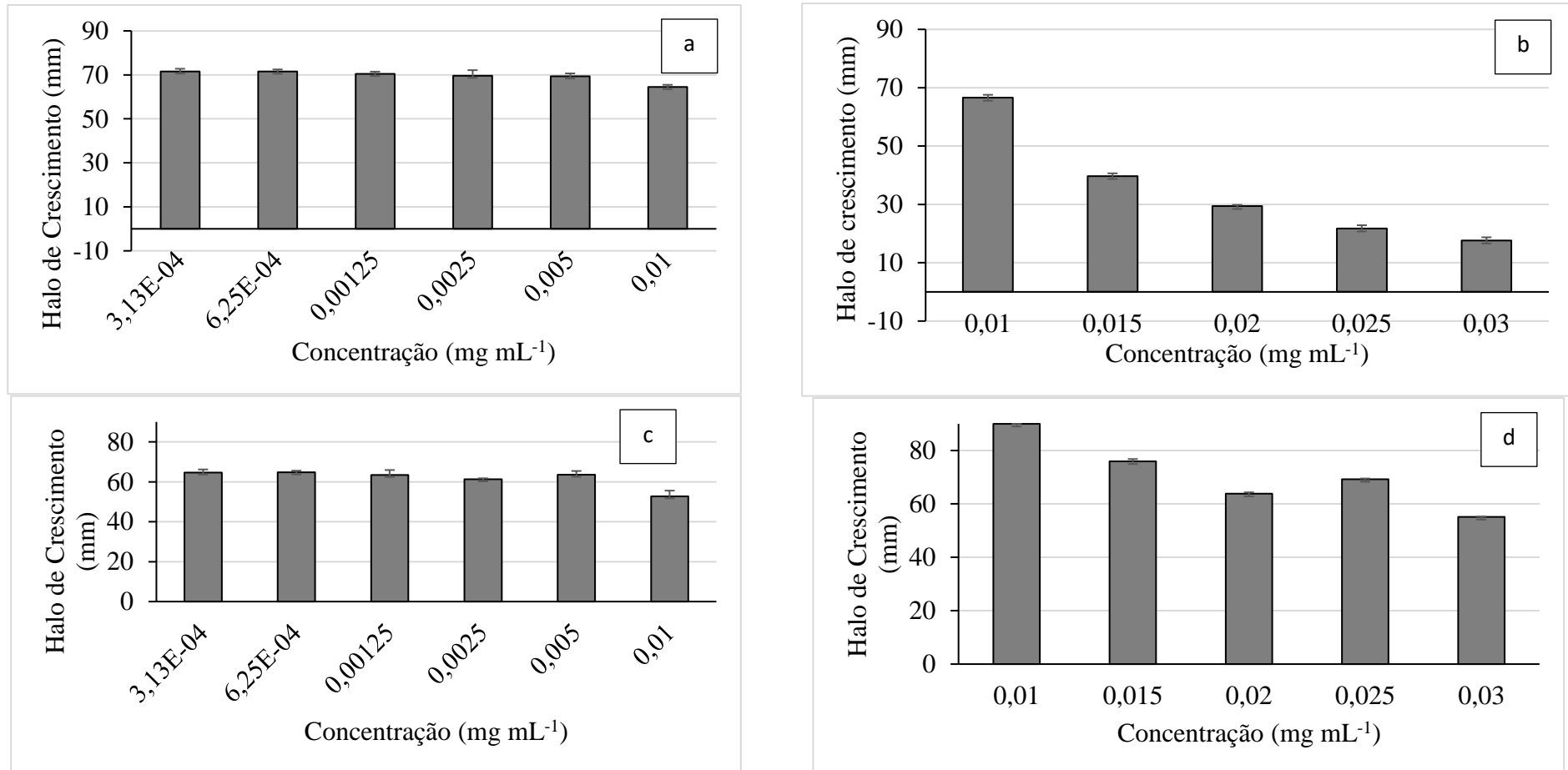
de 1% do crescimento fúngico, mostrando uma ação de cerca de 111 vezes maior quando comparada a família de iturina ( $0,033 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (Tabela 16), revelando o grande potencial em combater o agente da antracnose.

O resultado da CIM obtido para a família de iturina corrobora com a pesquisa de ARROYAVE-TORO; MOSQUERA; VILLEGAS-ESCOBAR, (2017), na qual obtiveram uma CIM para a iturina A de  $0,032 \text{ mg mL}^{-1}$ , contra o *Colletrotrichum acutatum*.

A potencial ação antifúngica das famílias de iturina e surfactina no combate a antracnose também foi relatado por Guardado-valdivia et al., (2018), na qual o caldo fermentado pela cepa *B. atrophaeus* B5 conseguiu combater o *Colletrotrichum gloeosporioides* nos frutos da gravioleira e do abacateiro.

O papel antagônico dos lipopeptídeos produzidos pelo *B. subtilis* CNPMS 22 contra os agentes das doenças da fusariose e da antracnose proporcionam uma nova abordagem para atacar esses fitopatógenos, pois os resultados experimentais evidenciaram forte atividade antifúngica, mostrando que os lipopeptídeos podem auxiliar a reduzir o uso de fungicidas químicos, a poluição ambiental, levando alimentos mais seguros para a população.

Figura 16- Halo de crescimento do *Colletotrichum Musae* nas diluições trabalhadas do teste de CIM. (a) Extrato bruto; (b) Fengicina; (c) Iturina e (d) Surfactina.



Fonte: Autor, 2019.

## Citotoxicidade dos extratos

As amostras testadas não apresentaram potencial citotóxico em nenhuma das linhagens tumorais e nem em célula não tumoral, pois os percentuais de inibição do crescimento celular ficaram abaixo do valor de referência (cut off) que é de 75%, portanto as amostras não são tóxicas (Tabela 17). Alguns artigos de revisão já relatam que os lipopeptídeos não apresentam toxicidade para células humanas (BARROS et al., 2007; MANDAL; BARBOSA; FRANCO, 2013; SILVA et al., 2015).

Tabela 17- Média do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras na concentração única de 100 µg/mL (extrato) e 10 µg/mL (composto isolado).

Amostra	HCT-116 IC%	SD	HL60 IC%	SD	SNB-19 IC%	SD	L929 IC%	SD
Extrato bruto	0	1,7	2,62	3,34	14,33	2,94	0	3,9
Fengicina	0	2,7	7,06	2,42	9,85	2,09	6,09	4,7
Surfactina	4,39	4,4	0	3,41	10,71	3,74	14,93	3,1
Iturina	0	4,8	0	3,85	8,26	1,62	0	0,2

\* HCT-116 (cólon - humano), HL60 (Leucêmica), SNB-19 (Astrocitoma) e L929 (Fibroblasto murinho).  
Fonte: Autor, 2019.

A baixa citotoxicidade das frações revela um resultado positivo para a aplicabilidade dos lipopeptídeos produzidos, isolados e testados no presente trabalho, podendo ser utilizado como um agente antifúngico sem ocasionar danos à saúde humana, mostrando sua enorme aplicabilidade em vários ramos industriais, como por exemplo, na agricultura, nas indústrias farmacêuticas, cosméticos e na indústria de alimentos, no armazenamento de grãos, na elaboração de biofilmes e revestimentos alimentícios.



## CONCLUSÃO

Diante dos resultados pode-se concluir que o *Bacillus subtilis* CNPMS 22 é um microrganismo que fornece um bio-recurso alternativo para o controle de fitopatógenos. Os resultados revelaram que a família de fengicina é ideal para o combate ao agente da fusariose, pois apresentou a menor CIM, com 0,0002 mg mL<sup>-1</sup> e a família de surfactina para o combate ao agente da antracnose, pois apresentou a menor CIM, com 0,0003 mg mL<sup>-1</sup>. Os dados de CIM do *Colletotrichum musae* para o extrato bruto e fengicina foram inconclusivos. A baixa citotoxicidade das frações revela um resultado positivo para a aplicabilidade dos lipopeptídeos no controle de fitopatógenos, uma vez que não afetaram as células humanas. Evidenciando que os lipopeptídeos podem auxiliar a reduzir o uso de fungicidas químicos, a poluição ambiental e fornecer a população alimentos livres de defensivos químicos.

## 5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados pode-se concluir que o *Bacillus subtilis* CNPMS 22 é um microrganismo que fornece um bio-recurso alternativo para o controle de fitopatógenos, uma vez que possui a capacidade de produzir diferentes famílias de lipopeptídeos que podem ser utilizadas como um defensivo agrícola natural, sem ocasionar danos à saúde humana, pois apresentaram baixa citotoxicidade e grande potencial para inibir do crescimento fúngico das linhagens de *Fusarium pallidoroseum* e *Colletotrichum musae*, em baixas concentrações.

O método de quantificação desenvolvido e validado é uma ferramenta útil para o controle de qualidade industrial no monitoramento da produção das famílias de lipopeptídeos, pois dependendo da aplicabilidade pode-se alterar alguns parâmetros do processo fermentativo para tentar direcionar o metabolismo microbiano para a produção de uma determinada família específica e assim este método auxiliará na verificação da quantidade produzida do composto alvo, tornando o processo mais específico e produtivo para as indústrias.

Através do estudo de ampliação de escala foi possível constatar que o fracionamento dos lipopeptídeos pode ser realizada com a carga de 60 mg. Com relação aos parâmetros de desempenho, a escala preparativa apresentou uma produtividade duas vezes maior comparada a escala semi-preparativa, entretanto, o seu consumo de solvente foi quatro vezes maior. O fracionamento por partição líquido-líquido revelou que se o alvo for a família de surfactina, uma simples partição pode ser realizada, o que pode impulsionar a obtenção dessas biomoléculas isoladas.

Já o estudo de associação das técnicas de separação (HPLC e partição líquido-líquido) revelou que a associação é vantajosa quando se trabalha em escala preparativa, pois considerando uma produção contínua durante 24 h, teremos uma economia de tempo suficiente para correr mais sete corridas cromatográficas e também a economia de solvente suficiente para realizar mais cinco corridas cromatográficas, tornando o processo de separação desses compostos mais produtivo.

## 6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os processos apresentados nesta tese correspondem ao início dos estudos na tentativa de alavancar o processo de produção e fracionamento dos lipopeptídeos. Existem muitas melhorias e modificações a serem feitas, sobretudo na perspectiva de torná-lo num processo fabríco, com todas as etapas integradas numa só unidade, tornando a possibilidade de obter estes compostos em larga escala industrial.

Em relação aos estudos fundamentais, é necessário compreender melhor o metabolismo microbiano do *Bacillus subtilis* CNPMS 22 para evidenciar quais parâmetros fermentativos favorecem ou desfavorecem a produção de uma determinada família específica e assim obter a máxima produção da molécula alvo. Com relação ao processo de fracionamento, faz-se necessário testar outros métodos, como por exemplo, a cromatografia em contracorrente, uma vez que é uma técnica que proporciona economia de solvente, possibilita o reciclo de solvente e não precisa de colunas cromatográficas caras para realizar a separação dos compostos. Assim testando outras metodologias de separação será possível verificar qual a técnica é a mais econômica e viável para o fracionamento destes lipopeptídeos em escala industrial. Outro estudo é testar as famílias de lipopeptídeos contra outras linhagens fúngicas que ocasionam perdas econômicas na agricultura para ampliar a gama de fungos que os lipopeptídeos possuem ação e assim ter uma maior aplicabilidade destes compostos.

Finalmente, para se considerar um processo integrado que inclui desde o processo fermentativo, extração dos compostos, fracionamento é necessário correlacionar todas estas etapas no que respeita à velocidade de processamento verificando a produtividade, custos operacionais e impactos ambientais causados na fabricação dos lipopeptídeos. Uma análise fundamental a ser realizada é a análise de ciclo de vida que tem por objetivo avaliar os possíveis impactos ambientais causados por um processo fabríco. Essa análise é capaz de verificar também os gargalos envolvidos em toda cadeia produtiva e indica quais operações unitárias necessitarão de ajustes e melhorias para tornar o processo ambientalmente sustentável e rentável para as indústrias, o que representa ainda muito esforço e trabalho futuro.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; HASSOUNA, N. A. Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. **Biochem Biotechnol**, p. 305–325, 2008.
- ACCINELLI, C. et al. Aflatoxin contamination of corn under different agro-environmental conditions and biocontrol applications. **Crop Protection**, [s.l.], v. 63, p. 9–14, 2014.
- ARROYAVE-TORO, J. J.; MOSQUERA, S.; VILLEGAS-ESCOBAR, V. Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. **Biological Control**, [s.l.], v. 114, n. 7, p. 195–200, 2017.
- BARBOSA, P. G. A. et al. Statistical Analysis for Quality Adjustment of the Analytical Curve for Determination of Pesticide Multiresidue in Pineapple Samples. **Food Analytical Methods**, 2017.
- BARBOSA, P. G. A. et al. Statistical Analysis for Quality Adjustment of the Analytical Curve for Determination of Pesticide Multiresidue in Pineapple Samples. **Food Analytical Methods**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 466–478, 2018.
- BARROS, F. F. C. et al. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 409–414, 2007.
- BEHARY, N. et al. Adsorption of surfactin produced from *Bacillus subtilis* using nonwoven PET (polyethylene terephthalate) fibrous membranes functionalized with chitosan. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 90, n. 1, p. 137–143, 2012.
- BEN AYED, H. et al. Wound healing and in vitro antioxidant activities of lipopeptides mixture produced by *Bacillus mojavensis* A21. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 50, n. 6, p. 1023–1030, 2015.
- BIE, X.; LU, Z.; LU, F. Identification of fengycin homologues from *Bacillus subtilis* with ESI-MS/CID. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 79, n. 3, p. 272–278, 2009.
- BINIARZ, P.; ŁUKASZEWICZ, M. Direct quantification of lipopeptide biosurfactants in biological samples via HPLC and UPLC-MS requires sample modification with an organic solvent. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 101, n. 11, p. 4747–4759, 2017.
- BONA, E. A. M. DE et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s.l.], v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.
- BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l.], v. 41, n. 7, p. 423–431, 2011.

- BRUNNER, G. Counter-current separations. **Journal of Supercritical Fluids**, [s.l], v. 47, n. 3, p. 574–582, 2009.
- CANTRELL, C. L.; DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Natural products as sources for new pesticides. **Journal of Natural Products**, [s.l], v. 75, n. 6, p. 1231–1242, 2012.
- CAO, Y. et al. 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, 2012.
- CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, [s.l], v. 31, n. 5, p. 427–439, 2006.
- CAWOY, H. et al. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. **Microbial Biotechnology**, [s.l], v. 8, n. 2, p. 281–295, 2015.
- CHEN, L. et al. Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. **Bioresource Technology**, [s.l], v. 101, n. 22, p. 8822–8827, 2010.
- CHEN, Q. et al. Antifungal Lipopeptides Produced by *Bacillus* sp . FJAT-14262 Isolated from Rhizosphere Soil of the Medicinal Plant *Anoectochilus roxburghii*. **Appl Biochem Biotechnol**, [s.l], p. 155–167, 2017.
- CHEN, W. C.; JUANG, R. S.; WEI, Y. H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l], v. 103, p. 158–169, 2015.
- CHINTKUNTLA. Effect of intercropping of maize, bean, cabbage and toxicants on the population levels of some insect pests and associated predators in sugar beet plantations. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, [s.l], v. 65, n. 1, p. 21–28, 2015.
- COSTA, G. M. et al. Isolation of C-glycosylflavonoids with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from *Passiflora bogotensis* Benth by gradient high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s.l], v. 990, p. 104–110, 2015.
- DEBON, J. **Produção de biossurfactante por bacillus subtilis atcc 21332 em condição anaeróbia**. 2015. 165 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos)- Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- DENG, Q. et al. A sensitive method for simultaneous quantitative determination of surfactin and iturin by LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l], v. 409, n. 1, p. 179–191, 2017.
- DEY, G. 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, 2015.

DHANARAJAN, G. et al. Development and Scale-up of an Efficient and Green Process for HPLC Purification of Antimicrobial Homologues of Commercially Important Microbial Lipopeptides. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [s.l.], v. 4, n. 12, p. 6638–6646, 2016b.

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.

DJ, F. Probit Analysis. **Cambridge University Press**, p. 256, 1982.

DONG, M. . **Modern HPLC for practicing scientists**. United States of America: [s.n.].

EEMAN, M. 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, 2014.

FABRE, H. Validation des méthodes d ' électrophorèse capillaire appliquées à l ' analyse des composés pharmaceutiques. **Analisis**, [s.l.], v. 27, n. 2, 1999.

FENG, W. et al. Retention behaviour of proteins under conditions of column overload in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 729, n. 1–2, p. 43–47, 1996.

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.

FIGUEIREDO, J. E. F. et al. Atividade antagonista in vitro de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo. **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, p. 667–673, 2010.

GAN, P. et al. *Bacillus*-produced surfactin attenuates chronic inflammation in atherosclerotic lesions of ApoE<sup>-/-</sup> mice. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 35, p. 226–234, 2016.

GEISLER, M. et al. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) for the simultaneous quantification of the cyclic lipopeptides Surfactin, Iturin A and Fengycin in culture samples of *Bacillus* species. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s.l.], v. 1044–1045, p. 214–224, 2017.

GOLDSON, S. L. et al. If and when successful classical biological control fails. **Biological Control**, [s.l.], v. 72, p. 76–79, 2014.

GRITTI, F. et al. Semi-preparative high-resolution recycling liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1566, p. 64–78, 2018.

GUARDADO-VALDIVIA, L. et al. Identification and characterization of a new *Bacillus atrophaeus* strain B5 as biocontrol agent of postharvest anthracnose disease in soursop (*Annona muricata*) and avocado (*Persea americana*). **Microbiological Research**, [s.l], v. 210, n. July 2017, p. 26–32, 2018.

GUEDES, J. A. . **Validação de método analítico empregando QuEChERS e CG-EM para determinação multirresíduo de agrotóxico em goiaba**. 2015, 117 f. Dissertação (Mestrado em Química), Departamento de Química- Universidade Federal do Ceará, 2015.

GUO, Q. et al. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. **Microbiological Research**, [s.l], v. 169, n. 7–8, p. 533–540, 2014.

HORN, J. N.; CRAVENS, A.; GROSSFIELD, A. Interactions between fengycin and model bilayers quantified by coarse-grained molecular dynamics. **Biophysical Journal**, [s.l], v. 105, n. 7, p. 1612–1623, 2013.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, M. **Preparative Chromatographic Techniques: application in natural product isolation**. [s.l: s.n.].

HUANG, X. et al. The positive effects of Mn<sup>2+</sup> on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [s.l], v. 29, n. 2, p. 381–389, 2015.

ICH. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015**, [s.l], v. 1, n. June, p. 18, 2014.

INÈS, M.; DHOUHA, G. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, [s.l], v. 71, p. 100–112, 2015.

INOUE, K. et al. An approach to on-line electrospray mass spectrometric detection of polypeptide antibiotics of enramycin for high-speed counter-current chromatographic separation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l], v. 51, n. 5, p. 1154–1160, 2010.

JACQUES, P. Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. In: [s.l.] Biosurfactants, **Microbiology Monographs**, 2011. v. 20p. 57–91.

JANDERA, P.; KOMERS, D. Effects of the gradient profile on the production rate in r.pdf. [s.l], v. 760, p. 25–39, 1997.

JIANG, S. et al. Separation of five flavonoids from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn) grains via off-line two dimensional high-speed counter-current chromatography. **Food Chemistry**, [s.l], v. 186, p. 153–159, 2015.

JOSÉ, I. et al. Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantiomericamente puras ou enriquecidas em larga escala. **Química Nova**, [s.l], v. 29, n. 5, p. 1027–1037, 2006.

KAWAGOE, Y. 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, 2015.

KIWALA, D. et al. Center-cut separation of intermediately adsorbing target component by 8-zone simulated moving bed chromatography with internal recycle. **Journal of Chromatography A**, [s.l], v. 1453, p. 19–33, 2016.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. DE. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, [s.l], v. 4, p. 12–20, 2010.

LEITÃO, G. G. Uso da cromatografia contracorrente na obtenção de padrões de origem vegetal. **Revista Fitos**, [s.l], v. 1, n. 2, p. 48–52, 2005.

LIANG, J. et al. A novel 9??9 map-based solvent selection strategy for targeted counter-current chromatography isolation of natural products. **Journal of Chromatography A**, [s.l], v. 1400, p. 27–39, 2015.

LIU, J. F. et al. Chemical structure, property and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in petroleum recovery and spill mitigation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l], v. 16, n. 3, p. 4814–4837, 2015.

LIU, Q. 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, n. 3, p. 31–37, 2014.

LORENA DE OLIVEIRA, F.; SANDRA DE CÁSSIA, D. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química Nova na Escola**, [s.l], v. 39, n. 3, p. 228–236, 2017.

MA, Z.; HU, J. Production and Characterization of Surfactin-Type Lipopeptides as Bioemulsifiers Produced by a *Pinctada martensii*-Derived *Bacillus mojavensis* B0621A. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l], v. 177, n. 7, p. 1520–1529, 2015.

MALFANOVA, N. et al. Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. **Archives of Microbiology**, [s.l], v. 194, n. 11, p. 893–899, 2012.

MANDAL, S. M.; BARBOSA, A. E. A. D.; FRANCO, O. L. Lipopeptides in microbial infection control: Scope and reality for industry. **Biotechnology Advances**, [s.l], v. 31, n. 2, p. 338–345, 2013.

MAPA. **Da qualidade analítica Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária** Brasília-BR, 2011. Disponível em: file:///C:/Users/carol/Downloads/Manual-de-Garantia-Analitica-ilovepdf-compressed-ilovepdf-compressed (3).pdf. Acesso em: 19 out. 2017



MARSOUSI, S. et al. Liquid-liquid extraction of calcium using ionic liquids in spiral microfluidics. **Chemical Engineering Journal**, [s.l], v. 356, n. December 2017, p. 492–505, 2019.

MARTINS, F. I. C. C.; BARBOSA, P. G. A ; ZOCOLO, G. J.; NASCIMENTO, R. F. Method Validation Using Normal and Weighted Linear Regression Models for Quantification of Pesticides in Mango (*Mangifera indica* L.) Samples. **Chromatographia**, [s.l], v. 49, n. 6221, p. 12, 2018.

MEENA, K. R. et al. Two factor at a time approach by response surface methodology to aggrandize the *Bacillus subtilis* KLP2015 surfactin lipopeptide to use as antifungal agent. **Journal of King Saud University - Science**, 2018.

MEENA, K. R.; KANWAR, S. S. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: Applications in food safety and therapeutics. **BioMed Research International**, [s.l], v. 2015, 2015.

MENG, X. et al. Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast disease. **Biological Control**, [s.l], v. 85, p. 46–51, 2015a.

MENG, Y. et al. Quantification of Lipopeptides Using High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection after Derivatization. **Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, [s.l], v. 31, n. 5, p. 377–82, 2015b.

MNIF, I. et al. Antifungal efficiency of a lipopeptide biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* SPB1 versus the phytopathogenic fungus, *Fusarium solani*. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l], v. 22, n. 22, p. 18137–18147, 2015.

MONACI, L. et al. Rapid profiling of antimicrobial compounds characterising *B. subtilis* TR50 cell-free filtrate by high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution Orbitrap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s.l], v. 30, n. 1, p. 45–53, 2016.

OIRAM FILHO, F. **Isolamento em escala preparativa de ácidos anacárdicos provenientes do líquido da casca da castanha do caju (LCC)**. 2017. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

OLIVEIRA, C. et al. Manejo da Resinose do Cajueiro. **Comunicado técnico**, [s.l], n. 85, 2009.

OLIVEIRA, F. H. P. C. **Fisiologia de *Bacillus subtilis* r14: crescimento e produção de lipopeptídeos em cultivos descontínuos**. 2006. 68 f, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2006.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, [s.l], v. 16, n. 3, p. 115–125, 2008.

PARK, S. Y. et al. Surfactin exhibits neuroprotective effects by inhibiting amyloid  $\beta$ -mediated microglial activation. **NeuroToxicology**, [s.l], v. 38, p. 115–123, 2013.

PATHAK, K. 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, 2012.

PATHAK, K. V.; KEHARIA, H. Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. **3 Biotech**, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 283–295, 2014.

PEREIRA DIAS, R. Produtos Fitossanitários Com Uso Aprovado Para Agricultura Orgânica Brasil. p. 9, 2016.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. Purificação de produtos biotecnológicos . Barueri: **Manole**, p. 440, 2005.

PIEDRAHÍTA-AGUIRRE, C. A.; ALEGRE, R. M. 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, 2014.

RANGARAJAN, V.; DHANARAJAN, G.; SEN, R. Bioprocess design for selective enhancement of fengycin production by a marine isolate *Bacillus megaterium*. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 99, p. 147–155, 2015.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, [s.l.], v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SAJITHA, K. L.; DEV, S. A. Quantification of antifungal lipopeptide gene expression levels in *Bacillus subtilis* B1 during antagonism against sapstain fungus on rubberwood. **Biological Control**, [s.l.], v. 96, p. 78–85, 2016.

SARWAR, A. et al. Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 209, n. January, p. 1–13, 2018.

SEBRAE. Cenários Prospectivos. **Cenários Prospectivos**, p. 1–30, 2016.

SHIBUSAWA, Y. et al. Three-phase solvent systems for comprehensive separation of a wide variety of compounds by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1133, n. 1–2, p. 119–125, 2006.

SHIH, I. L. et al. Production of antifungal lipopeptide from *Bacillus subtilis* in submerged fermentation using shake flask and fermentor. **Korean Journal of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 26, n. 6, p. 1652–1661, 2009.

SILVA, M. T. SANTOS et al. Integral production and concentration of surfactin from *Bacillus* sp. ITP-001 by semi-batch foam fractionation. **Biochemical Engineering Journal**, p. 4–10, 2015.

SIVAN, A.; ELAD, Y.; CHET, I. Biological Control Effects of a New Isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. **Phytopathol**, [s.l.], v. 74, p. 498–501, 1984.

SOUZA, C. G. et al. Simultaneous quantification of lipopeptide isoforms by UPLC-MS in the fermentation broth from *Bacillus subtilis* CNPMS22. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 410, n. 26, p. 6827–6836, 3 out. 2018.

SZEKERES, A. et al. Rapid purification method for fumonisin B1 using centrifugal partition chromatography. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [s.l.], v. 30, n. 1, p. 147–155, 2013.

TEIXEIRA, J. E. F. F. M. A.; BRESSAN, W.; CASELA, N. F. J. P. C. R. Avaliação da Atividade Antagonista da Bactéria Endofítica CNPMS-22 sobre Fungos Fitopatogênicos In Vitro - Comunicado Técnico 186- **Embrapa**. p. 1–3, 2006.

TERAO, D. et al. Estratégias de Controle de Podridões em Pós-Colheita de Melão: uma Revisão. **Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos**, **112**, [s.l.], n. 1677–1915, 2008.

VALPUESTA, R. R. F. Otimização da Produção de Biossurfactante por Isolado *Bacillus subtilis* a partir de Matéria-Prima Renovável e de Baixo Custo. **Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química**, 2008, p. 104, 2008a.

VALPUESTA, R. R. F. O. **Otimização da Produção de Biossurfactante por Isolado *Bacillus subtilis* a partir de Matéria-Prima Renovável e de Baixo Custo**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, p. 104, 2008b.

VIANA ET AL. Recomendações para o Controle das Principais Doenças que Afetam a Cultura do Melão na Região Nordeste. **Circular técnica Embrapa**, [s.l.], n. 1676–6601, p. 24, 2001.

VILLEGAS-ESCOBAR, V. et al. Lipopeptides from *Bacillus* sp. EA-CB0959: Active metabolites responsible for in vitro and in vivo control of *Ralstonia solanacearum*. **Biological Control**, [s.l.], v. 125, n. June, p. 20–28, 2018.

WAEWTHONGRAK, W.; LEELASUPHAKUL, W.; MCCOLLUM, G. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* ABS-S14 elicit defense-related gene expression in citrus fruit. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 9, n. 10, 2014.

WANG, J. et al. Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology**, [s.l.], v. 39, n. 1, p. 98–102, 2004.

WANG, T. et al. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 744–754, 2015.

WANG, X. et al. Application of high-speed counter-current chromatography for preparative separation of cyclic peptides from *Vaccaria segetalis*. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s.l.], v. 879, n. 11–12, p. 811–814, 2011.

WANG, Y. 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, 2010.

- WEEDEN, G. S.; WANG, N. L. Speedy standing wave design of size-exclusion simulated moving bed : Solvent consumption and sorbent productivity related to material properties and design parameters. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1418, p. 54–76, 2015.
- WETZEL, S. et al. Biology-oriented synthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, [s.l.], v. 50, n. 46, p. 10800–10826, 2011.
- YAHYA, N. et al. A review of integrated photocatalyst adsorbents for wastewater treatment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s.l.], v. 6, n. June, p. 7411–7425, 2018.
- YANAGIDA, A. et al. Comprehensive separation of secondary metabolites in natural products by high-speed counter-current chromatography using a three-phase solvent system. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1151, n. 1–2, p. 74–81, 2007.
- YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V. 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, 2012a.
- YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V. et al. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. **Biological Control**, [s.l.], v. 60, n. 3, p. 280–289, 2012b.
- YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V.; FALCONÍ, C. E. Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on Andean lupin seeds by lipopeptide production. **Biological Control**, [s.l.], v. 122, n. April, p. 67–75, 2018.
- YANG, H. 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, 2015.
- YAO, C. et al. A strategy for establishment of practical identification methods for Chinese patent medicine from systematic multi-component characterization to selective ion monitoring of chemical markers: Shuxiong tablet as a case study. **RSC Adv.**, [s.l.], v. 6, n. 69, p. 65055–65066, 2016.
- YE, Y. FENG et al. Identification of Antifungal Substance (Iturin A2) Produced by *Bacillus subtilis* B47 and Its Effect on Southern Corn Leaf Blight. **Journal of Integrative Agriculture**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 90–99, 2012.
- YIN, H. et al. The separation of flavonoids from *Pongamia pinnata* using combination columns in high-speed counter-current chromatography with a three-phase solvent system. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1315, p. 80–85, 2013.
- YUAN, B. et al. Study of the anti-sapstain fungus activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CGMCC 5569 associated with *Ginkgo biloba* and identification of its active components. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 114, p. 536–541, 2012.

YUAN, J. et al. Quantification of the antifungal lipopeptide iturin A by high performance liquid chromatography coupled with aqueous two-phase extraction. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s.l], v. 879, n. 26, p. 2746–2750, 2011.

ZHANG, D. 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, 2014.

ZHANG, P. et al. Separation of amlodipine besilate enantiomers by biphasic recognition recycling high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, [s.l], v. 146, p. 276–283, 2015.

ZHAO, J.; YAO, S.; LIN, D. Adsorbents for Expanded Bed Adsorption: Preparation and Functionalization. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [s.l], v. 17, n. 4, p. 678–687, 2009.

ZHAO, X. et al. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. **Microbiological Research**, [s.l], v. 168, n. 9, p. 598–606, 2013.

ZOUARI, I. et al. Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. **Biological Control**, [s.l], v. 100, p. 54–62, 2016.

ZOUARI, R.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI-AYDI, D. Optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 Biosurfactant Production Under Solid-state Fermentation Using By-products of a Traditional Olive Mill Factory. **Achievements in the Life Sciences**, [s.l], v. 8, n. 2, p. 162–169, 2014.