


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

The logo of the Universidade Federal do Amazonas is a circular emblem. It features a green laurel wreath that encircles a central shield. The shield is divided into four quadrants by a cross. The top-left quadrant contains a red cluster of berries, the top-right contains three pink flowers, the bottom-left contains a yellow star, and the bottom-right contains a yellow sun. The text "UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS" is written in a light grey font along the top inner edge of the circle, and "IN UNIVERSA SCIENTIA VERITAS" is written along the bottom inner edge.

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS**  
**AMAZÔNICAS PRODUTORAS DE LIPOPEPTÍDEOS**  
**BIOATIVOS**

**ADRIANA SPIROTTA STEIN MESQUITA**

**MANAUS**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ADRIANA SPIROTTA STEIN MESQUITA\***

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS**  
**AMAZÔNICAS PRODUTORAS DE LIPOPEPTÍDEOS**  
**BIOATIVOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

**Orientador:** Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

**Co- Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Antônia Queiroz Lima de Souza

\*Bolsista CAPES

**MANAUS**

**2015**

## Ficha Catalográfica

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

M582s Mesquita, Adriana Spirotto Stein  
Seleção de Bactérias Endofíticas Amazônicas Produtoras de  
Lipopeptídeos Bioativos / Adriana Spirotto Stein Mesquita. 2015  
140 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Afonso Duarte Leão de Souza  
Coorientadora: Antônia Queiroz de Lima Souza  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do  
Amazonas.

1. Lipopeptídeos. 2. Bactérias Endofíticas. 3. Espectrometria de  
Massas. 4. Amazônia. I. Souza, Afonso Duarte Leão de II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

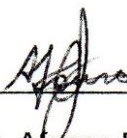
**“SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS  
AMAZÔNICAS PRODUTORAS DE LIPOPEPTÍDEOS  
BIOATIVOS”**

**Adriana Spirotto Stein Mesquita**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovada em 15 de Setembro de 2015

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza  
Universidade Federal do Amazonas  
Orientador



---

Prof. Dr. Sergio Massayoshi Nunomura  
(Membro UFAM)



---

Prof.ª Dr.ª Jacqueline Aparecida Takahashi  
(Externo/UFMG)

Universidade Federal do Amazonas  
Manaus, 15 de Setembro de 2015.

*Aos meus pais José Antonio Stein e Luzia Spirotto Stein, pelo amor, dedicação e todo esforço para me proporcionar uma boa educação; a minha segunda mãe Rísoleide Mesquita, pelo companheirismo, carinho e motivação; e, como não podia deixar de ser, dedico este trabalho ao meu marido Denny Mesquita que sempre esteve ao meu lado com muito amor, carinho e paciência.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, pela dádiva da vida, pelas pessoas que colocou em meu caminho, pela possibilidade de realizar um trabalho tão edificante e satisfatório, e por me auxiliar nos momentos de dificuldade e aflição.

Aos meus pais, José Antônio Stein e Luzia Spirotto Stein, o meu muito obrigada por todo o amor, carinho, ensinamentos, além de todo esforço e dedicação para sempre me proporcionar o melhor e por acreditarem que eu poderia alcançar todos os meus sonhos.

À minha família em especial aos meus segundos pais Maria Risoleide e Sérgio Mesquita, aos tios Maria Rizely e Aroldo Alves e cunhados Sérgio Junior e Rodrigo Mesquita pelo apoio, e pelo carinho, atenção e cuidado dispensado aos meus filhos. Aos tios Risenilde e Júnior, cunhados Lindsay Mesquita e Diogo Torres, primos Kelvin e Simone, Ryzivan e Gabriela, avôs Lina Ramos, José Vidal e Elizabeth pelo incentivo dedicado a mim e por acreditar que eu pudesse conseguir realizar esse sonho e alcançar meus objetivos.

Ao meu amado marido, Denny Mesquita, a quem sou eternamente grata pela enorme ajuda e paciência, por seu carinho, amor e companheirismo em todo o momento, por estar sempre perto com alguma palavra amiga e de incentivo, pelo apoio sempre com muita disposição e compreensão nos momentos difíceis, além da confiança depositada em mim. Aos meus dois filhos Giuseppe Mesquita e Giovanni Mesquita, que são minha inspiração e motivação, amo muito vocês.

Ao Professor Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, pelo voto de confiança, pelo apoio nos momentos de dúvidas, pela orientação, pelos ensinamentos e por confiar a mim um trabalho tão fascinante.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Antonia Queiroz Lima de Souza, por sua dedicação, orientação, amizade, pela maneira carinhosa com que resolve os problemas, pelo carinho e afetos maternos, que auxiliaram muito na realização do meu trabalho, pela alegria em trabalhar e ensinar, e por me guiar pelo fantástico mundo dos microrganismos, servindo como alguém em quem eu deva me espelhar na minha vida profissional.

Aos Professores Jefferson Rocha, Marcos Machado, Rita de Cássia Saraiva, Cecília Nunez pelos conhecimentos repassados e paciência durante as disciplinas cursadas.

Aos professores Maria Lúcia Belém e Sergio Nunomura, pelas colaborações e esclarecimentos durante o exame de conhecimento.

À equipe do Laboratório do Grupo de Espectrometria e Microrganismos da Amazônia-GEMMA, Sandro, Fátima, Sara, Paulo, Rafael, Larissa, Greiciane, Rachid, pela amizade, pelo auxílio e por me ensinarem diversas técnicas de cultivos e testes biológicos, com certeza vocês agora já fazem parte da minha vida na pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Espectrometria de Massas, Richardson Almeida, Bruna Ribeiro e Elzalina Soares pelo incentivo e pelas análises realizadas.

Aos amigos Felipe Moura e Héctor Kooler pelos ensinamentos e realização de análises por espectrometria de Massas.

Minha enorme gratidão à amiga Adriana Silva pelos primeiros ensinamentos e ajuda na realização do cultivo das bactérias endofíticas.

**A todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho e aqueles que acreditaram em mim e tinham certeza que eu era capaz, até quando eu mesmo duvidava, à vocês muito obrigada.**

*“Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes,  
porque o Senhor é contigo por onde quer que  
andares”. (Josué: 1:9)*



## RESUMO

Os microrganismos endofíticos, especialmente bactérias e fungos, são assim denominados por viverem no interior das plantas, habitando inclusive suas raízes, sem lhes causar aparentemente nenhum dano. As bactérias e os fungos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica, pois produzem inúmeras classes de substâncias e podem participar de processos biotecnológicos industriais diversos. Entre as substâncias produzidas por bactérias, os lipopeptídeos são uma classe que tem atraído grande interesse por suas atividades antifúngica, antibiótica e surfactante entre outras. No presente trabalho foram selecionadas 50 linhagens de bactérias endofíticas amazônicas para serem avaliadas por ensaios antimicrobianos e quanto à produção de lipopeptídeos por ESI-ITMS<sup>2</sup>. Destas, 25 linhagens produziram lipopeptídeos, sendo seis isoladas de planta do gênero *Gustavia*, nove de *Macrofitia*, cinco de *Duguetia*, uma de *Pothomorpha*, duas de *Rollina* e uma de *Bryophyllum*. As análises de fragmentação por ESI-MS<sup>2</sup> no modo negativo dos extratos lipopeptídicos identificaram oito homólogos da surfactina de C11 - C18, entre os quais o C11, C17 e C18 ainda não foram relatados na literatura. Em ensaios biológicos de culturas pareadas, 48 linhagens apresentaram atividade antimicrobiana de microparasitismo contra as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli*, 27 linhagens contra as bactérias Gram-positiva *S. aureus*, 29 linhagens contra *E. faecalis* e 28 contra *C. albicans*, apresentando também atividade de competição frente a 21 linhagens contra *E. faecalis* e *C. albicans*, 23 linhagens contra *S. aureus* e 2 linhagens contra *P.aeruginosa* e *E. coli*. Não foi observada nenhuma linhagem com atividade antibiótica. Na avaliação da bioatividade dos extratos lipopeptídicos, 13 extratos destas linhagens apresentaram antibiose frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

**Palavras-Chave:** Lipopeptídeos, bactérias endofíticas, espectrometria de massas.

## ABSTRACT

The endophytic microorganisms, particularly bacteria and fungi live in the plants, including their roots apparently cause no harm. Bacteria and fungi are potentially useful in agriculture and industry, particularly in the food and pharmaceutical industries, as they produce different chemical classes and can participate in various industrial biotechnological processes. Among the compounds produced by bacteria, lipopeptides belong to a class that has attracted great interest for its antifungal, antibiotic and surfactant among others. In this study 50 strains were selected of Amazonian endophytic bacteria for antimicrobial evolution and the production of lipopeptides by ESI-ITMS<sup>2</sup>. Of these, 25 strains produced lipopeptides, six plant isolated from *Gustavia* genus, nine *Macrophyte*, five *Duguetia*, one *Pothomorpha*, two *Rollina* and one *Bryophyllum*. The fragmentation analysis by ESI-MS<sup>2</sup> in negative mode identified eight extracts the lipopeptide surfactin homologs of C11 - C18, including C11, C17 and C18 not been reported in the literature. In biological assays paired cultures, 48 strains showed mycoparasitism antimicrobial activity against Gram-negative bacteria *P. aeruginosa* and *E. coli*, 27 strains against Gram-positive bacteria *S. aureus*, *E. faecalis*, 29 strains against and 28 against *C. albicans*, also presenting competition activity against *E. faecalis* 21 strains and *C. albicans* strains against 23 *S. aureus* strains and 2 against *P.aeruginosas* and *E. coli*. No strain with antibiotic activity observed. In assessing the bioactivity of lipopeptide extracts, 13 of the extracts strains showed antibiosis against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C.albicans*.

**Keywords:** Lipopeptides, endophytic bacteria, mass spectrometry.

## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

<b>IT</b>	<i>“Ion trap”</i>
<b>EM</b>	Espectrometria de Massas
<b>ESI</b>	<i>“Ionização Electrospray”</i>
<b>MS</b>	<i>“Mass Spectrometry”</i>
<b>m/z</b>	Relação massa/carga
<b>LP</b>	Lipopeptídeos
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleíco
<b>YM</b>	<i>Yeast-Malt</i>
<b>MH</b>	<i>Miller Hilton</i>
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>ppm</b>	Parte por milhão
<b>µg</b>	Micrograma
<b>mg</b>	Miligrama
<b>ESA- UEA</b>	Escola Superior de Ciências da Saúde- Universidade do Estado do Amazonas
<b>GEMMA</b>	Grupo de Espectrometria de Massas e Microrganismos da Amazônia
<b>SPE</b>	<i>“Solid Phase Extraction”</i>
<b>DHT</b>	Transferência dupla de hidrogênio

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estrutura do lipopeptídeos antibiótico daptomicina .....	37
<b>Figura 2.</b>	Estrutura do principal homólogo (iso-C <sub>15</sub> da surfactina). Isoformas: <b>(A)</b> Surfactina A, <b>(B)</b> Surfactina B e <b>(C)</b> Surfactina C .....	44
<b>Figura 3.</b>	Estrutura do principal homólogo (n-C <sub>13</sub> ) da iturina. Isoforma: <b>(A)</b> Iturina A, <b>(B)</b> Iturina C .....	46
<b>Figura 4.</b>	Estrutura do principal homólogo (n- C <sub>16</sub> da fengicina). Isoformas: <b>(A)</b> Fengicina A, <b>(B)</b> Fengicina B .....	49
<b>Figura 5.</b>	Classes heterogêneas de compostos naturais sintetizados por NRPS .....	52
<b>Figura 6.</b>	Rotas biossintética da surfactina .....	53
<b>Figura 7.</b>	<b>Microrganismos utilizados para fins científicos:</b> (a) <i>Staphylococcus aureus</i> , (b) <i>Enterococcus faecalis</i> , (c) <i>Escherichia coli</i> , (d) <i>Pseudomonas aeruginosas</i> e (e) <i>Cândida albicans</i> .....	57
<b>Figura 8.</b>	Extração líquido- líquido do extrato LP76 .....	67
<b>Figura 9.</b>	Filtragem do extrato LP76 em NaOH aquoso em filtros de membrana Millipore 0,45µ .....	68
<b>Figura 10.</b>	Extração em SPE do extrato LP76 .....	68
<b>Figura 11.</b>	Extração líquido-líquido do meio ácido da amostra LP76 .....	69
<b>Figura 12.</b>	Espectros de massas ESI-ITMS: <b>(A)</b> Modo negativo e <b>(B)</b> Modo positivo para as linhagens, 17 (Gh Cc3 1.2a), 42 (GhCr3 1.1a) e 50 (GhCc1 2.1) .....	78
<b>Figura 13.</b>	Espectros de massas ESI-ITMS: <b>(A)</b> Modo negativo e <b>(B)</b> Modo positivo para as linhagens, 76 (Folha BDA1.3.1), 84 (Folha BDA 1.4.1) e 164 (Ppc12.2b) .....	79
<b>Figura 14.</b>	Espectros de massas ESI-ITMS: <b>(A)</b> Modo negativo e <b>(B)</b> Modo positivo para as linhagens, 196 (DgCr2 1.1b), 207 (AnspR1 1.3) e 229 (Dfga1. 1. 2) .....	80
<b>Figura 15.</b>	Espectro de ESI-ITMS da amostra do método 1 no modo negativo .....	82
<b>Figura 16.</b>	Espectro de ESI-ITMS das amostras do método 2 no modo negativo. <b>(A)</b> Fração da fase orgânica e <b>(B)</b> Fração da fase aquosa .....	83
<b>Figura 17.</b>	Espectro de ESI-ITMS das frações do método 3 no modo negativo: <b>(A)</b> Fração da fase aquosa da amostra e <b>(B)</b> Fração MeOH .....	83
<b>Figura 18.</b>	Espectro de ESI-IT-MS no modo negativo da amostra do meio ácido da linhagem 76 por análise direta .....	84
<b>Figura 19.</b>	Espectros de ESI-IT-MS no modo negativo das frações do meio ácido obtidos por extração líquido- líquido. <b>(A)</b> Fração da fase orgânica e <b>(B)</b> Fração da fase aquosa .....	84
<b>Figura 20.</b>	Espectros de massas ESI-ITMS no modo positivo para as linhagens LP17, (Gh Cc3 1.2 a), LP42 (GhCr3 1.1a), LP50 (GhCc1 2.1), LP76 (Folha BDA1.3.1), LP84 (Folha BDA 1.4.1) e LP164 (Ppc12.2b).....	86
<b>Figura 21.</b>	Espectros de massas ESI-ITMS no modo positivo para as linhagens, LP196 (DgCr2 1.1b), LP207 (AnspR1 1.3) e LP229 (Dfga1. 1. 2) .....	87
<b>Figura 22.</b>	<b>(A)</b> Estrutura do lipopeptídeo C15 da surfactina apresentando as regiões de fragmentações e a nomenclatura <b>y</b> e <b>b</b> proposta por Roepstorff–	

	Fohlmann–Biemann. <b>(B)</b> . Espectro de ESI no modo positivo do íon sodiatado de $m/z$ 1058 .....	89
<b>Figura 23.</b>	Fragmentação do íon de $m/z$ 1058 por: <b>(a)</b> Clivagem simples <b>(b)</b> Clivagem com transferência dupla de hidrogênio .....	91
<b>Figura 24.</b>	Fragmentação do íon de $m/z$ 1058 por: <b>(b)</b> Clivagem com transferência dupla de hidrogênio .....	92
<b>Figura 25.</b>	Espectros de ESI-MS <sup>2</sup> no modo negativo dos extratos LP: <b>(A)</b> 17 <b>(B)</b> 42 <b>(C)</b> 50 <b>(D)</b> 76 <b>(E)</b> 84 <b>(F)</b> 164 <b>(G)</b> 196 <b>(H)</b> 207 e <b>(I)</b> 229 .....	94
<b>Figura 26.</b>	<b>(A)</b> Estrutura da surfactina C15 apresentando as regiões e a nomenclatura <i>y</i> e <i>b</i> das fragmentações por ESI-MS <sup>2</sup> . <b>(B)</b> . Espectro de massa no modo negativo do íon de $m/z$ 1034 .....	97
<b>Figura 27.</b>	Proposta de fragmentação para o íon de $m/z$ 1016 .....	98
<b>Figura 28.</b>	Proposta de fragmentação do íon de $m/z$ 692 .....	98
<b>Figura 29.</b>	Proposta de fragmentação da surfactina para os íons de $m/z$ 452 e 339 ....	99
<b>Figura 30.</b>	Proposta de fragmentação da surfactina para os íons de $m/z$ 353, 323 e 240 .....	100
<b>Figura 31.</b>	Espectros de ESI-MS <sup>2</sup> no modo negativo dos íons de $m/z$ 978, 1062 e 1076 .....	101
<b>Figura 32.</b>	Teste por culturas pareadas (Metodologia de Christensen) para a bactéria endofítica, linhagem 17 (GhCc3.1.2. <b>(A)</b> Atividade de microparasitismo, contra as bactérias patogênicas <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> e <b>(B)</b> Atividade de competição contra <i>S. aureus</i> e <i>E. faecalis</i> .....	105
<b>Figura 33.</b>	Halos de inibição de <i>C. albicans</i> dos extratos LP 17, 39, 50, 73, 164, 196, 207 e 229 após 48 horas .....	107
<b>Figura 34.</b>	Halos de inibição de <i>S. aureus</i> dos extratos LP 17, 41, 42 e 50 após 48 horas .....	108
<b>Figura 35.</b>	Halos de inibição de <i>P. aeruginosa</i> dos extratos LP 84, 164, 207 e 229 após 48 horas .....	108
<b>Figura 36.</b>	Relação da atividade de antibiose dos extratos LP da tabela 12 com os homólogos da surfactina .....	109
<b>Figura 37.</b>	Espectros de ESI-ITMS no modo negativo das linhagens 41, 48, 156, 174, 181, 185, 189 e 191 .....	136
<b>Figura 38.</b>	Espectros de ESI-ITMS no modo negativo das linhagens 108, 54, 56, 81, 66, 65 e 127 .....	136
<b>Figura 39.</b>	Espectros de ESI-ITMS no modo negativo das linhagens 105, 109, 68, 67, 63 e 73 .....	137
<b>Figura 40.</b>	Espectros de ESI-ITMS no modo negativo das linhagens 39, 47, 59, 64, e 82 .....	137
<b>Figura 41.</b>	Espectros de ESI-ITMS no modo negativo das linhagens 91, 148, 158, 222 e 223 .....	138
<b>Figura 42.</b>	Espectros de ESI-ITMS no modo negativo das linhagens 224, 234, 23, 243 e 254 .....	138
<b>Figura 43.</b>	Espectros de ESI-ITMS no modo negativo das linhagens 257, 258, 259, 264 e 265 .....	139
<b>Figura 44.</b>	Espectros de ESI-ITMS <sup>2</sup> dos íons fragmentos de sódio $[M+Na]^+$ <b>(A)</b> $m/z$ 1030, <b>(B)</b> 1044 e <b>(C)</b> 1072, presentes no extrato LP76 .....	139
<b>Figura 45.</b>	Espectros de fragmentação ESI – MS <sup>2</sup> no modo negativo dos íons de $m/z$ 992, 1006, 1020, 1034 e 1048 presentes no extrato LP 50 .....	141

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Medicamentos lançados no mercado entre os anos de 2000-2010 a partir de origem microbiana com referência ao seu composto ativo, classificação e área terapêutica .....	26
<b>Tabela 2.</b>	Sequência peptídica e principais cadeias de ácidos graxos para os lipopeptídeos da família da surfactina .....	43
<b>Tabela 3.</b>	Sequência peptídica e principais cadeias de ácidos graxos para os lipopeptídeos da família da Iturina .....	45
<b>Tabela 4.</b>	Sequência peptídica e principais cadeias de ácidos graxos para os lipopeptídeos da família da Fengicina .....	48
<b>Tabela 5.</b>	Bactérias endofíticas isoladas de plantas da Amazônia .....	61
<b>Tabela 6.</b>	Identificação de lipopeptídeos em amostras dos sobrenadantes das linhagens de bactérias endofíticas através da análise de ESI-ITMS no modo negativo e positivo .....	77
<b>Tabela 7.</b>	Íons detectados por fragmentação (ESI-ITMS <sup>2</sup> ) dos homólogos da surfactina a partir dos íons percusores de $m/z$ 1030, 1044, 1058 e 1072 .....	91
<b>Tabela 8.</b>	Íons detectados por fragmentação (ESI-MS <sup>2</sup> ) dos homólogos da surfactina a partir dos íons percusores [M-H] <sup>-</sup> de $m/z$ 978, 992, 1006, 1020, 1034, 1048, 1062 e 1076 .....	100
<b>Tabela 9.</b>	Resultados do bioensaio em culturas pareadas (Metodologia de Christensen) das bactérias endofíticas contra patógenos humanos ..	103
<b>Tabela 10.</b>	Resultados do teste de antibiose em difusão em ágar dos extratos das bactérias endofíticas e os principais íons detectados por ESI-MS <sup>2</sup> .....	106

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b>	Varição dos lipopeptídeos produzidos por <i>Bacillus subtilis</i>	39
<b>Esquema 2.</b>	Representação da cadeia lateral ácido graxo da surfactina para <i>n</i> , <i>iso</i> e <i>anteiso</i> .....	42
<b>Esquema 3.</b>	Metodologia de extração e purificação dos lipopeptídeos .....	70
<b>Esquema 4.</b>	Metodologia descrita para o bioensaio de culturas pareadas pelo método de Christensen (1991). <b>(A)</b> Teste contra <i>S. aureus</i> , <i>E.</i> <i>faecalis</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> . <b>(B)</b> Teste contra <i>C. albicans</i> ....	73
<b>Esquema 5.</b>	Representação esquemática da estrutura química geral de um peptídeo apresentando a nomenclatura proposta por Roepstorff- Fohlmann-Biemann dos fragmentos formados devido à transferência de energia para o peptídeo .....	87
<b>Esquema 6.</b>	Ilustração do rearranjo de McLafferty de um resíduo amino em uma cadeia peptídica onde: (a) O local e a direção da clivagem da transferência do $\gamma$ -H pelo Rearranjo interresíduo de McLafferty e (b) O local e a direção da clivagem $\gamma$ -H pelo Rearranjo intraresíduo de McLafferty .....	89
<b>Esquema 7.</b>	Representação da clivagem $\gamma$ e $\delta$ a partir do resíduo do ácido Aspártico .....	94

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
2.1 Produtos naturais derivados de microrganismos como fonte de produtos .....	23
2.2 Microrganismo endofítico .....	28
2.3 Bactéria endofítica .....	32
2.4 Lipopeptídeos .....	36
2.4.1 Família da surfactina .....	38
2.4.2 Família da iturina .....	45
2.4.1 Família da fengicina .....	47
2.5 Peptídeos sintetizados pela via não ribossomal .....	49
2.6 Microrganismos mais comumente utilizados em testes microbianos .....	53
2.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	54
2.6.2 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	54
2.6.3 <i>Escherichia coli</i> .....	55
2.6.4 <i>Pseudomonas aeruginosas</i> .....	56
2.6.5 <i>Candida albicans</i> .....	56
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	58
3.1 Geral .....	59
3.2 Específico .....	59
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	60
4.1 Linhagens de bactérias endofíticas selecionadas .....	61
4.2 Materiais e meio de cultura .....	62
4.2.1 Meio de Cultivo para a Fermentação .....	62
4.2.2 Meio de cultivo para o crescimento dos microrganismos teste .....	63
4.2.3 Esterelização dos meios e equipamentos .....	63
4.3 Equipamentos de análises .....	63
4.3.1 Seleção das linhagens produtoras de lipopeptídeos por ESI-ITMS .....	63
4.3.2 Análises das amostras de lipopeptídeos em equipamento de baixa resolução..	64
4.3.3 Análises das amostras de lipopeptídeos em equipamento de alta resolução ...	64
4.4 Procedimento experimental .....	64
4.4.1 Pré-inóculo e condições de cultivo .....	64
4.4.2 Obtenção do sobrenadante .....	65
4.4.3 Seleção das linhagens produtoras de lipopeptídeos por espectrometria de	
massas .....	65
4.5 Extração dos Lipopeptídeos .....	66
4.6 Seleção do método para purificação dos extratos lipopeptídicos .....	66
4.6.1 Análise direta no ESI-ITMS do extrato LP76 .....	67
4.6.2 Purificação por extração líquido-líquido .....	67
4.6.3 Purificação por extração em fase sólida (SPE) .....	68
4.7 Avaliação da extração dos lipopeptídeos por precipitação ácida .....	69
4.7.1 Análise direta no ESI-ITMS do meio ácido .....	69
4.7.2 Extração líquido-líquido – meio ácido .....	69
4.8 Análises dos extratos lipopeptídeos em equipamento de baixa resolução .....	71
4.9 Análises dos extratos lipopeptídeos em equipamento de alta resolução .....	71
4.10 Avaliação da atividade antibiótica .....	71
4.10.1 Microrganismos teste .....	71
4.10.2 Reativação dos microrganismos teste .....	72



4.10.3 Bioensaio em culturas pareadas – teste de Christensen .....	73
4.10.4 Bioensaio pelo teste de difusão em Ágar .....	73
4.10.4.1 Preparo das amostras e dos controles .....	74
4.10.4.2 Teste de difusão em Ágar .....	74
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
5.1 Seleção das linhagens produtoras de lipopeptídeos por ESI-ITMS .....	76
5.2 Extração e purificação dos lipopeptídeos .....	81
5.2.1 Comparação entre os métodos de purificação .....	81
5.2.2 Avaliação da extração dos lipopeptídeos por precipitação .....	83
5.3 Identificação e caracterização dos lipopeptídeos presentes nos extratos selecionados por ESI-ITMS de baixa resolução .....	84
5.3.1 Caracterização dos lipopeptídeos por ESI-ITMS <sup>2</sup> de baixa resolução .....	86
5.3.2 Caracterização dos lipopeptídeos por ESI-MS <sup>2</sup> de alta resolução .....	92
5.4 Avaliação da atividade antibiótica .....	102
5.4.1 Teste de Christensen .....	102
5.4.2 Avaliação da atividade antibiótica dos extratos dos sobrenadantes por difusão em ágar .....	106
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>113</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>115</b>
<b>8. APÊNDICE .....</b>	<b>135</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

O Brasil possui cerca de 20% da biodiversidade mundial, tendo a maior floresta tropical, especialmente concentrada na Região Amazônica, e é fonte importante de matérias-primas nas mais diversas áreas. No entanto, quase nada se conhece sobre sua diversidade biológica, tão pouco em delimitar quais são todos os tipos de interações prováveis entre microrganismos e outros integrantes do ecossistema (ROZSAK & COLWELL, 1987; PACE, 1997). Com isso, podemos dizer que as fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico.

Microrganismos, especialmente fungos e bactérias, são lembrados como causadores de doenças. Esta associação é natural, e, infelizmente, mesmo em uma época de tantos avanços científicos e tecnológicos, algumas infecções microbianas podem comprometer a vida de pacientes principalmente aqueles que apresentam o sistema imunológico debilitado. Esses processos patológicos frequentemente estão relacionados a fatores de virulência microbianos, que podem incluir substâncias químicas conhecidas como micotoxinas (LOPES et al., 2011). Outro fator se deve ao crescente uso de forma abusiva e indiscriminada dos tradicionais antibióticos e fungicidas, contribuindo para o surgimento de microrganismos patogênicos multirresistentes, tanto em humanos como em animais e plantas tornando um grande problema de saúde no mundo todo (MACIEL et al., 2002, SOUZA et al., 2003). Porém, microrganismos também são profícuos produtores de substâncias químicas com grande aplicação na indústria farmacêutica, pois são usadas como fármacos ou como estruturas-modelo para o planejamento e desenvolvimento de fármacos. Diversos antibióticos, anticancerígenos, imunossupressores e agentes redutores do colesterol sanguíneo, entre outros, têm suas origens em produtos naturais microbianos. Os microrganismos apresentam, portanto, uma

surpreendente capacidade de produzir substâncias químicas com elevado potencial biológico (LOPES et al., 2011).

É muito provável que os produtos naturais sejam resultados das interações entre organismos entre si e destes com o ambiente, e que desempenhem funções precisas e definidas nessas associações simbióticas, representando uma das vantagens adaptativas e evolutivas para os organismos produtores. Como consequência dessa função ecológica, os produtos naturais microbianos constituem fontes promissoras para a bioprospecção de novas moléculas com potencial aplicação na medicina (fármacos), agricultura (agroquímicos) e nos estudos de processos biológicos (biologia química). De fato, a investigação de microrganismos que vivem em associações simbióticas com outros organismos (ex.: plantas, insetos, organismos marinhos, nematoides), e mesmo em associação com outros microrganismos, vem sendo cada vez mais explorada na química de produtos naturais como uma alternativa para a busca de moléculas com atividade biológica. Desta forma há um imenso mercado para novas drogas de atividade antimicrobiana e sua descoberta em países de grande biodiversidade como o Brasil, o que faz com que as perspectivas para os estudos dos microrganismos endofíticos sejam bastante promissoras principalmente com a possibilidade da descoberta de novos antimicrobianos.

Dentre os microrganismos endofíticos destacam-se as bactérias. Entre as substâncias produzidas por estes microrganismos, os lipopeptídeos têm atraído grande interesse na área científica por suas atividades antifúngica, antibiótica, surfactante (BARROS et al., 2007) e anti-inflamatórias (KIM et al., 1998).

Os lipopeptídeos são capazes de alterar as propriedades físicas e/ou químicas de interfaces. Estes compostos podem atuar como antibióticos, agentes antivirais e antitumorais, imunomoduladores ou inibidores de enzimas e toxinas. O modo de ação de

muitos desses compostos não foi esclarecido até o momento, apesar de se saber que suas atividades de superfícies e de membrana desempenham um papel importante em diversos sistemas. Muitos lipopeptídeos possuem potentes atividades antibióticas e foram submetidos a diversos estudos na descoberta de novos antibióticos (BARROS et al., 2007).

Visando contribuir com o conhecimento químico e biológico de bactérias endofíticas amazônicas, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a partir de análises por ESI-ITMS<sup>n</sup> a produção de lipopeptídeos e realizar ensaios biológicos em busca de novas substâncias com potencial antibiótico.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **2.1 PRODUTOS NATURAIS DERIVADOS DE MICRORGANISMOS COMO FONTE DE PRODUTOS BIOATIVOS**

Produtos naturais microbianos representam uma apreciável fonte de estruturas químicas únicas que têm sido otimizadas durante a evolução e produzidas por comunicação e em resposta a mudanças no habitat microbiano, incluindo estresse ambiental. Assim, esses compostos possuem importante papel no processo de descoberta de fármacos (GROSS, 2009; GUNATILAKA, 2006; HERTWECK, 2009).

Os produtos naturais microbianos ao longo da última metade do século têm fornecido um valor de substâncias bioativas considerável para a indústria farmacêutica. Em particular, as áreas terapêuticas de doenças infecciosas e de oncologia têm se beneficiado muito das numerosas classes de fármacos derivados de fontes naturais, além de servirem como moldes para a modificação sintética. Cerca de 40 novos medicamentos lançados no mercado entre 2000 e 2010 são provenientes de plantas, microorganismos, organismos marinhos, vertebrados terrestres e invertebrados (BRAHMACHARI, 2012).

A alta diversidade química em produtos naturais, moléculas produzidas por organismos vivos, está relacionada com a disponibilidade de precursores e reações biossintéticas, além de sua função em determinado sistema biológico. A evolução das rotas biossintéticas dos produtos naturais está ligada às necessidades funcionais de seus ligantes, por isso há uma grande expectativa quanto à afinidade dos produtos naturais pelos diversos alvos biológicos existentes. Os produtos naturais possuem alta diversidade química, especificidade bioquímica e elevada afinidade quanto à ligação com receptores específicos (MOLINARI, 2009). Além disso, possuem outras características que ilustram a sua importância na busca de novos fármacos, como a complexidade e singularidade estrutural, associada ao amplo potencial biológico; são importantes ferramentas bioquímicas, seguindo como guia para a biologia molecular e estudos biossintéticos e

investigação das funções celulares (CLARDY & WALSH, 2004); auxiliam na descoberta de novos mecanismos de ação de fármacos (URIZAR et al., 2002), no desenho de compostos sintéticos e são as principais fontes de farmacóforos (KNIGHT et al., 2003). Comparando-se as principais fontes fornecedoras de compostos protótipos de novos fármacos (síntese orgânica, produtos naturais, química combinatória e coleções virtuais de compostos), a mais ampla diversidade química está associada às substâncias de origem natural (HARVEY, 2008).

Os microrganismos são uma fonte promissora na busca de diversos metabólitos bioativos e têm originado alguns dos mais importantes produtos para a indústria farmacêutica com aplicações em diversas áreas: antibacterianos, antifúngicos, antivirais, imunossuppressores, antitumorais, inibidores enzimáticos, agentes estimulantes da mobilidade gástrica, fármacos hipocolesterolêmicos, inseticidas, herbicidas, antiparasitários entre outras (DEMAIN & SANCHEZ, 2009).

A exploração de microrganismos como fonte de substâncias terapêuticamente úteis, além de ser muito mais curta em relação ao uso de plantas na medicina, tem se destacado pela grande quantidade de substâncias ativas. Desde a descoberta da penicilina por Fleming em 1928, surgiram vários fármacos importantes baseados em metabólitos de fungos, incluindo antibióticos antibacterianos ( $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, macrolídeos, glicopeptídeos, lipopeptídeos e estreptograminas) (GUIMARÃES et al., 2010) e antibióticos antitumorais (antraciclina, bleomicinas, actinomicinas, mitomicinas) (PUPO et al., 2006).

Os produtos naturais, seus derivados sintéticos e compostos modelados em substâncias naturais representam grande contribuição dentre os fármacos aprovados no período de 1981-2010 (NEWMAN & CRAGG, 2007). Cerca de 38 medicamentos baseados em produtos naturais foram aprovados e lançados no mercado durante o período



de 2000 a 2010 (BRAHMACHARI, 2012), sendo 19 destes todos de origem microbiana (Tabela 1) incluindo a daptomicina (Cubicin) (RAJA et al., 2003), equinocandina B (Anidulafungina) (VAZQUEZ & SOBEL, 2006), pneumocandina B (Caspofungin) (GRAUL, 2002), FR901379 (micafungina) (JARVIS, et al., 2004) como representantes da classe dos lipopeptídeos antibióticos.

O desenvolvimento de resistência nos microrganismos patogênicos e células tumorais tem sido um dos maiores problemas de saúde da população, portanto, existe uma necessidade contínua de novos agentes antibióticos e antitumorais. Além disso, a toxicidade de antimicrobianos e antitumorais utilizados em tratamentos clínicos é responsável por uma série de efeitos colaterais, justificando assim a busca por substâncias mais eficazes e menos tóxicas (CLARDY et al., 2006; DEMAIN & SANCHEZ, 2009).

**Tabela 1.** Medicamentos lançados no mercado entre os anos de 2000-2010 a partir de origem microbiana com referência ao seu composto ativo, classificação e área terapêutica.

Ano	Nome Genérico / Comercial	Composto Ativo	Classe do Composto	Classific.	Área Terapêutica	Referências
2000	Gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®)	caliqueamicina	Antibiótico do tipo Enedina	DPN**	Anticâncer	BROSS et al., 2001; GILES et al., 2003
2001	Caspofungina (Cancidas®)	pneumocandina B	Lipopeptídeo antibiótico	SPN***	Antifúngica	GRAUL, 2002; McCORMACK & PERRY 2005
2001	Ertapenem (Invanz®)	tienamicina	Carbapenem antibiótico	DPN**	Antibacteriano	SHAD & ISSACA, 2003
2001	Cefditoren pivoxil (Spectracef®)	cefalosporina	Antibiótico $\beta$ -Lactâmico	DPN**	Antibacteriano	DARKES & PLOSKER, 2002
2002	Biapenem (Omegacin®)	tienamicina	Carbapenem do tipo $\beta$ -lactâmico	DPN**	Antibacteriano	MALANOSKI, 1993; CHEN & LIVERMORE, 1994.
2002	Hidrocloridrato de amrubicina (Calsed®)	doxorubicina	Antraquinona	DPN**	Anticâncer	FRANTZ & SMITH, 2003; GRAUL, 2004
2003	Daptomicina (Cubicin™)	daptomicina	Lipopeptídeos	PN*	Antibacteriano	RAJA et al., 2003; TALLY & DEBRUIN, 2000
2003	Micofenolato de sódio (Mifortic®)	ácido micofenólico	Antibióticos - ácidos graxos	PN*	Imunosupressor	GRAUL, 2004; FRANTZ, 2004
2004	Telitromicina (Ketek®)	eritromicina A	Macrolídeos	SPN***	Antibacterianos	ACKERMANN & RODLOFF, 2003; WELLINGTON, NOBLE, 2004
2005	Tigeciclina (Tigacil®)	tetraciclina	Tetraciclinas	SPN***	Antibacteriano	ROSE & RYBAK, 2006
2005	Doripenem (Finibax®/Doribax™)	tienamicina	Carbapenem do tipo $\beta$ -lactâmico	PN*	Antibacteriano	LISTER, 2007
2005	Micafungina (Micamina®/Funguard®)	FR901379	Lipopeptídeos macrocíclicos	SPN***	Antifúngica	JARVIS et al., 2004

2005	Fumagilina (Flisint®)	fumagilina	Antibiótico	PN*	Antiparasitários	LEFKOVE et al., 2007
2006	Anidulafungina (Eraxis™/ Ecalta™)	equinocandina B	Lipopeptídeo antibiótico	SPN***	Antifúngica	VAZQUEZ & SOBEL, 2006
2007	Temsirolimus (Torisel™)	sirolimus	Antibiótico macrólideo	SPN***	Anticâncer	GORE, 2007
2007	Ixabepilona (Ixempra™)	epotilona B	Antibiótico macrólideo	DPN**	Anticâncer	CONLIN et. al., 2007
2009	Telavancina (Vibativ™)	vancomicina	Lipoglicopeptídeo Antibiótico	SPN***	Antibacteriano	LAOHAVALEESON et al., 2007
2009	Romidepsin (Istodax®)	romidepsin	Depsipeptídico	PN*	Anticâncer	WOO et al., 2009
2010	Aztreonam (Cayston™)	aztreonam	Antibiótico	DPN**	Antibacteriano	RETSCH-BOGART et, al, 2009; ORLICEK & SHARI, 1999

Fonte: Adaptado de BRAHMACHARI, 2012. \*PN - Produto natural; \*\*DPN - Derivado de produto natural; \*\*\*SPN - Semissintético a partir de produto natural.

## 2.2 MICRORGANISMO ENDOFÍTICO

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e estão presentes nos mais variados ambientes interagindo com diversas formas de vida. Suas características peculiares conferem adaptação e sobrevivência em ambientes considerados hostis, desempenhando funções únicas e cruciais no funcionamento de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (MYERS, 1996; SCHIMMEL, 1995).

A palavra endofítico origina-se do grego (*endon*, no interior; *phyton*, planta) e o uso deste termo é tão amplo quanto sua definição literal. A denominação endófitos compreende principalmente fungos e bactérias (SCHULZ & BOYLE, 2005), mas algas (PETERS, 1991) e insetos (FELLER, 1995) também podem ser incluídos nesse grupo.

Petrini (1991) considerou microrganismos endofíticos ou simplesmente endófitos, aqueles que colonizam o interior de tecidos aéreos das plantas em alguma fase do seu ciclo de vida, sem lhes causar danos aparentes. Uma interpretação mais recente de Azevedo & Araújo (2007) define como microrganismos endofíticos todos aqueles cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar danos aparentes ao seu hospedeiro. A colonização dos endófitos pode ser intracelular e limitada a uma única célula, intercelular e localizada, e intra e intercelular sistêmica (STONE et al., 2000). A disseminação dos fungos e bactérias para as diversas partes da planta ocorre de maneira sistêmica, habitando de forma ativa o apoplasto e os vasos condutores (HALLMANN *et al.*, 1997). Os mais variados órgãos vegetais como folhas, ramos, caules, raízes e estruturas florais, tais como pólen, ovários, anteras e estames, podem ser colonizados. Contudo, fungos e bactérias endofíticos parecem apresentar diferentes preferências quanto às regiões da planta hospedeira que colonizam (ARAÚJO et al., 2010).

A comunidade microbiana endofítica, representada principalmente por diferentes espécies de fungos e bactérias, desempenham funções importantes no processo de adaptação da planta com o meio ambiente (AZEVEDO, 1998; MENDES & AZEVEDO, 2007). Deste modo, os endófitos diferem dos microrganismos epifíticos, os quais vivem na superfície das plantas, bem como dos microrganismos fitopatogênicos, que causam sintomas de doenças aos seus hospedeiros. Diferentemente dos microrganismos simbióticos, a colonização das plantas pelo endófito não forma estruturas visíveis no hospedeiro, como é comumente observada pela formação de nódulos em raízes colonizadas por bactérias fixadoras de nitrogênio conhecidas coletivamente como rizóbios (AZEVEDO, 1998).

Os microrganismos endofíticos são um grupo ainda pouco estudado e, embora tenham sido descritos desde o século XIX, só receberam importância no final do século XX a partir dos anos 70. Além de exercerem funções importantes para a sobrevivência do seu hospedeiro, os endófitos podem produzir metabólitos bioativos como toxinas, antibióticos e outros compostos de potencial interesse biotecnológico (AZEVEDO, 1998).

Endófitos têm sido detectados em todas as espécies vegetais já pesquisadas (STONE et al., 2000; STROBEL & DAISY, 2003). Estudos revelam uma diversidade cada vez maior de microrganismos endofíticos (OKI et al., 2008). Evidências de microrganismos associados às plantas foram detectadas em tecidos de folhas e ramos fossilizados (TAYLOR & TAYLOR, 2000), indicando que essas relações endofíticas podem ter evoluído a centenas de milhões de anos a partir do momento em que as plantas surgiram pela primeira vez sobre a terra (STROBEL, 2003).

Os microrganismos endofíticos tiveram um papel crucial na adaptação e seleção de diferentes espécies vegetais, estabelecendo, com a planta hospedeira, uma interação

mutualística, onde a planta protege e alimenta o microrganismo endofítico que, em troca, melhora o crescimento e a competitividade da planta hospedeira. Durante o processo evolutivo, a presença de alguns deles em determinadas plantas permitiu que elas se desenvolvessem melhor e fossem mais resistentes tanto a ataques de insetos, animais herbívoros e organismos patogênicos, quanto a condições ambientais adversas, como baixa umidade e/ou elevadas temperaturas e radiações (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000; OKI et al., 2008). Isto ocorre devido aos endófitos serem capazes de modificar as respostas das plantas aos estímulos ambientais, principalmente em relação à variação espacial e dinâmica vegetativa. Isso se deve à capacidade dos endófitos de modificar as plantas em nível genético, fisiológico e ecológico (LUCERO et al., 2006). Numa abordagem biotecnológica, fungos endofíticos podem ser alterados geneticamente com objetivo de introduzir características de interesse nas plantas hospedeiras (PAMPHILE et al., 2004).

Acredita-se que os metabólitos secundários bioativos produzidos por esses microrganismos possam estar diretamente associados com a planta hospedeira através da recombinação gênica entre as espécies durante a fase evolutiva. De fato, alguns dados da literatura têm mostrado a habilidade dos fungos endofíticos de produzir *in vitro* metabólitos secundários idênticos aos da planta hospedeira (BORGES et al., 2009; STROBEL et al., 2004). O mais marcante exemplo foi o isolamento do antitumoral taxol nos anos 90 realizado por Stierle et al. (1993) provando que o fungo endofítico *Taxomyces andreanea*, encontrado no interior da planta *Taxus brevifolia*, foi capaz de produzir este complexo diterpenoide, com atividade antimetabólica, utilizado contra câncer de ovário e de mama, bem como no tratamento de inúmeras doenças proliferativas de humanos. Outros produtos naturais vegetais anticancerígenos como, vincristina, camptotecina, podofilotoxina e hipericina (BORGES et al., 2009), foram também isolados de fungos

endofíticos associados aos respectivos hospedeiros vegetais, evidenciando que uma correspondência entre o metabolismo secundário da planta e de seus endófitos pode ser bastante comum (PIMENTEL et al., 2011). Nesse contexto, fica evidente a importância da etnobotânica nos estudos de bioprospecção por microrganismos endofíticos. Novos produtos naturais bioativos têm sido frequentemente descritos na literatura, demonstrando a relevância desses microrganismos (BORGES et al., 2009).

Deste modo, estes microrganismos representam um fornecedor alternativo de compostos fitoquímicos característicos das plantas (STROBEL & DASY, 2003; STROBEL et al., 2003). Do ponto de vista ecológico é extremamente importante a descoberta de fontes microbianas produtoras de fármacos de alto valor agregado, porém produzidos em quantidades reduzidas por espécies vegetais para garantir a preservação destas espécies, mantendo a produção de compostos que garantam a vida de pessoas afetadas por inúmeras doenças (AZEVEDO et al. 1998).

O estudo sobre o potencial de fungos e bactérias endofíticas para a área farmacêutica e biotecnológica tem sido relevante há vários anos, devido à descoberta de novas substâncias para uso terapêutico humano, como por exemplo, antibióticos, antifúngicos (AZEVEDO et al., 2000), antimaláricos e anticancerígenos (STROBEL et al., 2002; STROBEL & DAISY, 2003). Logo, o isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de plantas ainda não estudadas possibilitam a descoberta de novas espécies com potencial para produzir substâncias de interesse, tais como compostos com atividade antimicrobiana, que são de extrema importância para indústria farmacêutica (STROBEL & DAISY, 2003).

## 2.3 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

A constatação de bactérias endofíticas em tecidos de plantas saudáveis tem sido relatada para muitas espécies cultivadas, em diferentes estágios de crescimento (JACOBS, 1985; HINTON & BACON, 1995; STURZ, 1995).

Os gêneros mais comumente isolados destes microrganismos incluem: *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, que foram isoladas a partir de plantas agrícolas e macrófitas, sendo um dos principais e mais abundantes grupos de microrganismos que interagem com as plantas (HALLMAN et al., 1997; LODEWYCKX et al., 2002).

Rizobactérias que se instalam no interior das raízes das plantas, formando associações, são endofíticas. Mas o conceito estende-se ainda para bactérias que podem ser isoladas de plantas cujos tecidos foram desinfetados superficialmente ou extraídas do interior das plantas, e que não causam prejuízo visível às mesmas (GRAY & SMITH, 2005). Com isso, as bactérias endofíticas têm sido isoladas de raiz, nódulos, caules, folhas e frutos em uma extensa variedade de plantas (ARAÚJO et al., 2000). Acredita-se que as bactérias endofíticas se dispersam nas plantas através das sementes, propagação vegetativa, implementos agrícolas, ventos ou insetos (BALDANI, 1997). Uma vez presentes no solo, elas penetram na planta, via zona radicular, através de aberturas que ocorrem naturalmente como resultado do crescimento das plantas ou através de pelos radiculares (SPRENT & FARIA, 1988).

A maneira de penetração também pode ser pelas aberturas naturais, estômatos, lenticelas, hidatódios, ou por injúrias causadas por insetos e maquinário agrícola. Além disso, essas bactérias são capazes de degradar a parede celular das plantas pela liberação de enzimas hidrolíticas como celulases e pectinases, sendo essa uma possível forma de penetração. Embora observações demonstrem a possibilidade de mecanismos de



penetração ativa de algumas bactérias endofíticas, muito pouco se sabe sobre a origem e regulação dessas enzimas (LODEWYCKX *et al.*, 2002). Uma maneira diferente de penetração é descrita por Ashbolt & Inkerman (1990) em cana-de-açúcar através da associação com cochonilha, e por Kluepfel (1993) via diferentes insetos.

Então, pode-se dizer que a colonização endofítica pode ser intracelular e limitada ao interior de algumas células, intercelular localizada, e intra e intercelular, ao mesmo tempo, de maneira sistêmica (STONE *et al.*, 2000). Os diferentes mecanismos de distribuição das bactérias endofíticas podem estar relacionados com interações com outras bactérias ou com os diferentes mecanismos de cada microrganismo, que lhes permitem habitar vários nichos, representado pelos tecidos e, mais especificamente, pelos espaços intercelulares no interior de cada tecido (DI FIORI & DEL GALLO, 1995). Além disso, sua habilidade de sobreviver dentro de tecidos vegetais com pouca ou nenhuma competição microbiana, faz delas candidatas potenciais a aplicações biotecnológicas.

Um dos primeiros trabalhos com bactérias endofíticas foi realizado por Colombo (1978), no qual observou a presença de bactérias endofíticas nas zonas mais jovens dos talos de algas, entre sífões e dentro dos filamentos cenocíticos, além de se encontrarem próximo aos cloroplastos, o que indicaria uma ligação com a atividade fotossintética da alga e sua provável dependência de oxigênio. Esta ocorrência foi sugerida pelo autor como sendo um equilíbrio fisiológico entre a bactéria e seu hospedeiro.

As bactérias endofíticas têm sido alvo de vários estudos, com diferentes culturas, uma vez que elas possuem a habilidade de se manter dentro dos tecidos vegetais isentos da competição microbiana, além de serem menos afetadas pela temperatura, potencial osmótico e radiação ultravioleta (LODEWYCKX *et al.*, 2002), o que é uma vantagem ecológica sobre as bactérias epifíticas. Embora não seja, ainda, totalmente compreendida a interação entre esses microrganismos e seu hospedeiro (planta), o progresso tem sido

feito na aplicação dos metabólitos produzidos por essas bactérias, visto que estes possuem diversas funções biológicas (HALLMANN et al., 1997).

Dentre as bactérias endofíticas mais conhecidos, podemos destacar o grupo dos actinomicetos que são bactérias Gram-positivas as quais podem desenvolver micélio superficial e submerso (STROBEL, 2003). Estes constituem um grupo de bactérias conhecido principalmente por sua ampla produção de metabólitos secundários (antibióticos; enzimas extra-celulares, entre outros) (INBAR et al., 2005).

Os actinomicetos são também utilizados como agente de controle biológico, devido à sua ampla produção de antibióticos e compostos bioativos que atuam controlando fitopatógenos (GOODFELLOW & WILLIAMS, 1983).

O gênero *Streptomyces* spp, pertencente ao grupo dos actinomicetos, tem sido um dos mais estudados devido à diversidade de metabólitos secundários por ele produzidos com aplicações na medicina e na agropecuária (INBAR et al., 2005). Tal fato justifica o grande interesse comercial nesse grupo de bactérias, pois mais de 80% dos antibióticos produzidos industrialmente são processados por espécies desse gênero (CHALLIS & HOPWOOD, 2003).

CASTILLO et al. (2002) isolaram *Streptomyces* ssp. a partir de *Kennedia nigriscans*, planta medicinal nativa do norte da Austrália, produtora de mununbicina E4 e E5, um antibiótico de amplo espectro contra patógenos humanos e de plantas. Outro exemplo foi o trabalho realizado por STROBEL (2007) através do qual ficou constatada a atividade antifúngica de três *Streptomyces* endofíticos isolado das plantas medicinais *Thottea grandiflora*, *Polyalthia* ssp. e *Mapania* spp.

O gênero *Bacillus* é citado em alguns trabalhos como a principal bactéria endofítica que ocorre em determinadas plantas (HALLMANN et al., 1997). As espécies mais frequentemente citadas como endofíticas são: *Bacillus cereus* (ARAÚJO et al., 2002,

ARAÚJO et al., 2001, PLEBAN et al., 1995), *B. subtilis* (BAI et al., 2002, ARAÚJO et al., 2001), *B. insolitus* (STURZ et al., 1997), *B. brevis* (STURZ et al., 1997), *B. pumilus* (ARAÚJO et al., 2002, ARAÚJO et al., 2001) e *B. lentus* (ARAÚJO et al., 2001).

O gênero *Bacillus* é caracterizado como bactéria Gram-positiva, aeróbia ou anaeróbia facultativa, formato circular, e são principalmente conhecidos como produtores de antibióticos com atividade antagônica contra fungos e bactérias patogênicas (LOEFFLER et al., 1986; KREBS et al., 1998). Além disso, eles formam esporos que podem ser facilmente formulados, e tem alta viabilidade comparada com células vegetativas (BOCHOW et al., 1995).

A maioria dos antibióticos produzida por *Bacillus* ssp. tem sido caracterizado como dipeptídeos ou peptídeos cíclicos (LOEFFLER et al., 1986; NAKANO; ZUBER, 1990). A espécie de *Bacillus subtilis* é o principal produtor de peptídeos com aplicação tanto na área biotecnológica como farmacêutica. Uma classe bem conhecida são os lipopeptídeos incluindo a surfactina, iturina, fengicina, micosubtilina e bacilomicina, que possuem ação biosurfactante por seu caráter anfifílico e são peptídeos antibióticos com grandes atividades antimicrobianas entre outras. (VATER et al., 2002)

Cho e colaboradores (2009) concluíram que a bactéria *Bacillus pumilus* pode ser utilizada no controle dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, na inibição de aflatoxina por eles produzida, além de promover benefícios adicionais como ação antitumoral, antimicoplasmática, hemolítica e atividade fibrinolítica, quando adicionada no alimento.

Várias são as razões para que investigações sejam conduzidas com bactérias endofíticas, entre elas pode-se citar: i) carência de informações nos aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos para elucidar a interação entre bactérias e plantas; ii) escassez de dados a respeito de bactérias endofíticas em plantas da Região Amazônica, em relação ao

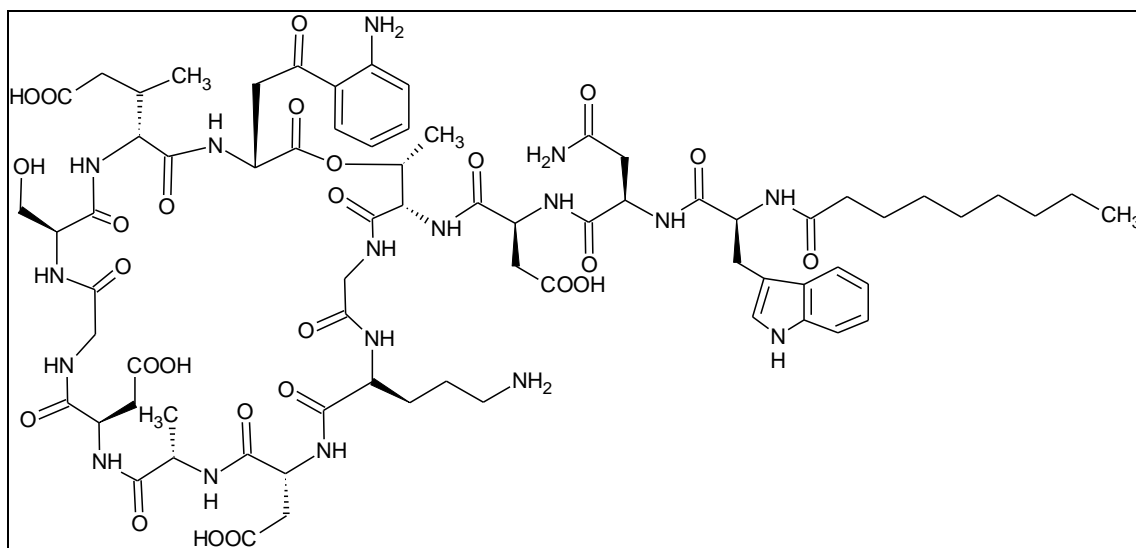
estudo de endófitos provenientes de plantas de clima equatorial; iii) vários endófitos produzem antibióticos e outros metabólitos de interesse farmacológico (AZEVEDO, et al, 2000; MARCON, 2002); iv) endófitos podem ser aplicados como agentes no controle biológico de pragas e de doenças (AZEVEDO, et al., 2000; STURZ et al., 2000) dentre outros.

## 2.4 LIPOPEPTÍDEOS

Os lipopeptídeos são sintetizados por uma ampla gama de gêneros de microorganismos, incluindo *Pseudomonas*, *Streptomyces roseosporus* e *Bacillus* (NISTSCHKE & PASTORE, 2002). Devido a sua excepcional capacidade de interagir com a membrana, os lipopeptídeos são bem conhecidos como antimicrobianos, embora na presença de compostos hidrofóbicos possam vir a agir como poderosos surfactantes exibindo uma ampla gama de atividades com diferentes aplicações na indústria farmacêutica e alimentícia.

A daptomicida (Figura 1) é um lipopeptídeo isolado de *Streptomyces roseosporus* e aprovado em 2003 para tratamento de infecções da pele causada por agentes patogênicos Gram positivos, e para bacteremia e endocardite provocadas por *Staphylococcus aureus* (NGUYEN et al., 2006). Seu mecanismo de ação envolve desorganização de múltiplas funções da membrana celular bacteriana sendo provável que todos os antibióticos lipopeptídicos apresentem alguma penetração na membrana devido às cadeias alquílicas, o que promove sua desorganização. Com isso, muitos compostos lipopeptídicos possuem potentes atividades antibióticas, e foram submetidos a diversos estudos na descoberta de novos antibióticos (LANG, 2002; KUIPER et al., 2004; NGUYEN et al., 2006; PATHAK et al., 2012). Em estudos de Lang (2002) e Kuiper e colaboradores (2004), o lipopeptídeo

viscosina, produzido por *Pseudomonas fluorescens*, apresentou atividade antifúngica no biocontrole de fungos fitopatógenos.



**Figura 1.** Estrutura do lipopeptídeo antibiótico daptomicina.

Outros lipopeptídeos antibióticos são produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, incluindo *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. globigii*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. megatarium* e *B. thurigiensis*, sendo, os mais conhecidos, divididos em três principais famílias: surfactina, iturina e fengicina (COOPER et al., 1981; NISTSCHKE & PASTORE, 2002; PATHAK et al., 2012; PERFUMO et al., 2010).

Alguns lipopeptídeos são considerados alternativas apropriadas para agentes antimicrobianos sintéticos e podem ser usados de modo seguro e efetivo como agente terapêutico, o que vem a ser particularmente importante, devido ao aumento no número de bactérias patogênicas resistentes, exigindo tratamentos constantes e a busca de outras linhas de tratamentos (SEYDLOVA & SVOBODOVA, 2008).

Esses compostos anfífilos são produzidos através de síntese não ribossômica de peptídeos, que segue um mecanismo de linha de montagem, envolvendo intermediários ativos acoplados em regiões específicas de enzimas multifuncionais, produzindo a partir

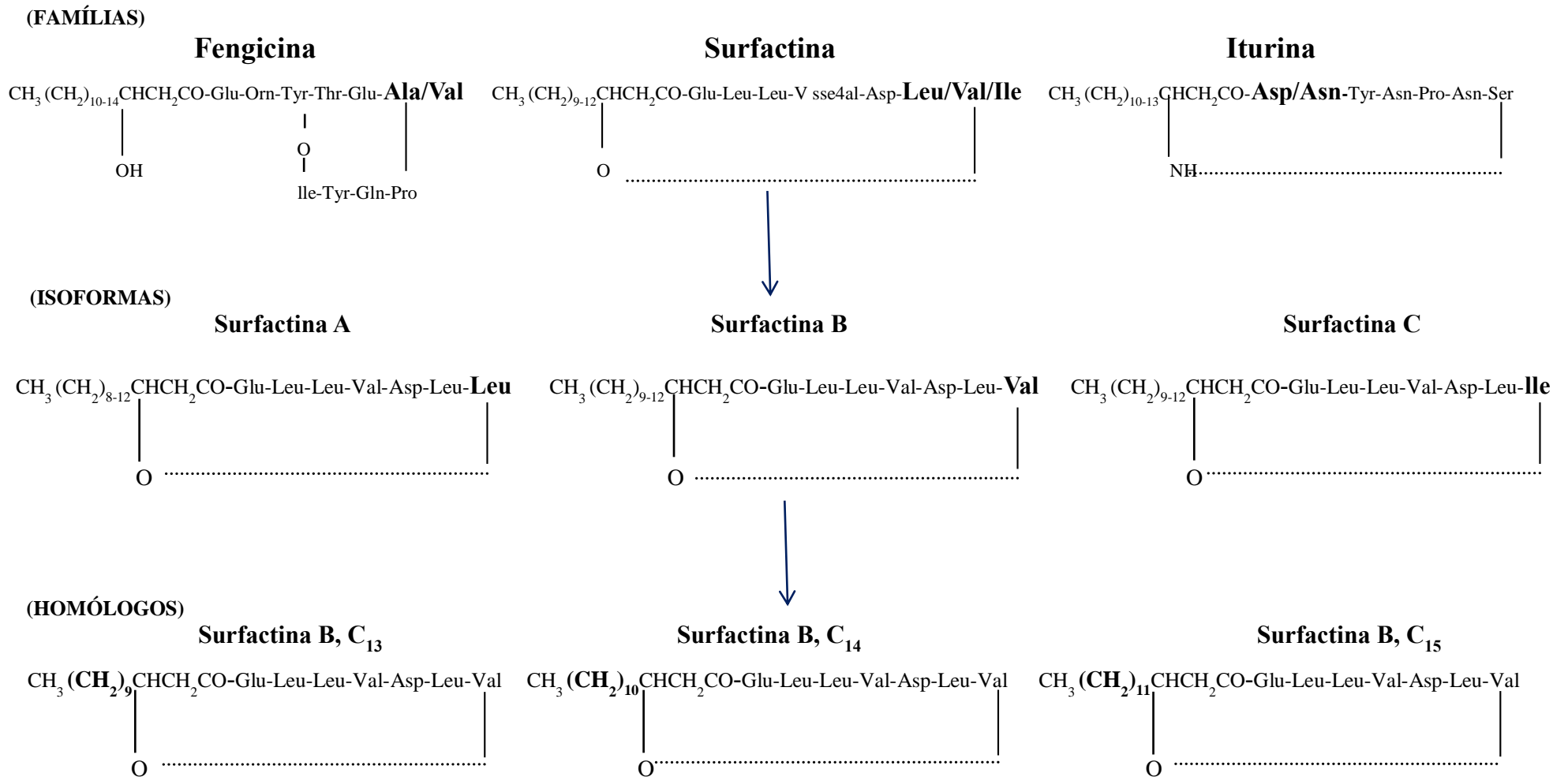
do crescimento microbiano, antibióticos e biossurfactantes normalmente excretados para o meio de cultura (ETCHEGARAY et al., 2008, CHEN et al., 2007).

As famílias dos lipopeptídeos subdividem-se em isoformas (Esquema 1), que diferem na composição dos aminoácidos da parte peptídica. As isoformas podem ainda ser subdividas em séries homólogas, que variam no número de átomos de carbono que compõem a cadeia lipídica (DELEU et al., 1999; VATER et al., 2002; ONGENA et al., 2007; ROMERO et al., 2007; JACQUES, 2011). A porção peptídica destas moléculas pode ser neutra ou aniônica e frequentemente estão dispostos em uma estrutura cíclica ligados a ácidos graxos  $\beta$ -amino (iturina) ou ácido  $\beta$ -hidroxi (surfactina e fengicina) com variação na cadeia lateral. (ALVAREZ et al. 2012; HATHOUT et al., 2000; JACQUES, 2011; ZHANG et al., 2013).

#### **2.4.1 Família da Surfactina**

A história da surfactina inicia-se a partir do ano de 1968, quando Arima e colaboradores identificaram a presença de um novo composto biologicamente ativo presente no caldo fermentativo de uma cepa de *Bacillus subtilis*. O nome surfactina surgiu devido à sua alta capacidade surfactante, e a sua estrutura foi elucidada quanto a de um lipopeptídeo macrolídeo (PEYPOUX, 1999).

A surfactina é um lipopeptídeos produzido por várias cepas de *Bacillus subtilis* (ARIMA et al., 1968; COSTA, et al, 2005) sendo mais conhecida por possuir excelentes propriedades tensoativas, capaz de baixar a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27,9 mN/m em concentrações tão baixas quanto 0,005% , além de reduzir a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 para valores menores que 1 mN/m. Exibe uma grande estabilidade em variações de pH, temperatura e força iônica (BARROS et al., 2007, DESAI & BANAT, 1997). É uma substância anfipática, que possui ampla atividade



**Esquema 1:** Variação dos lipopeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis*.  
 Adaptado de Dexter et al., 2008 e P. Jaques, 2011.

biológica, tal como, antifúngica, bactericida, antitumoral contra o carcinoma de Ehrlich, fibrinolítica, hemolítica, bem como a capacidade de lisar esferoplastos e protoplastos de várias bactérias (ULLRICH et al., 1991), hipocolesterolêmico (KAMEDA et al., 1974), anti-HIV (BONMATIN et al., 1995) efeitos imunomodulatório (PARK e KIM, 2009) e ainda atividade anti-inflamatória (KIM et al., 1998). Em relação à capacidade de destruir eritrócitos em meio ágar sangue, esta tem sido constantemente utilizada para ensaios de seleção de microrganismos produtores de surfactantes, sendo o tamanho do halo de hemólise associado com a capacidade de produção dessas substâncias (LIN, 1996), que podem ainda sofrer influência de alguns parâmetros, como, por exemplo, o pH e a cadeia hidrofóbica da molécula (número de carbonos e ramificações) (PROKOF'EVA et al., 1999). Segundo Bonmatin, (1995) as atividades biológicas da surfactina estão relacionadas com a sua capacidade de interagir com os cátions e fosfolípidios da membrana celular.

Nitschke (2004) avaliou a atividade antibiótica do lipopeptídeo surfactina produzido por uma cepa de *Bacillus subtilis* (LB5a) em meio de manipuladora. Foram testadas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, além de alguns fungos filamentosos e leveduras. Todas as bactérias apresentaram susceptibilidade ao produto, sendo *Pseudomonas aeruginosa* a mais sensível, entre as Gram-negativas, e *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus* as gram-positivas mais susceptíveis. O estudo não observou alteração no crescimento dos fungos e leveduras avaliados na presença do lipopeptídeo.

Por outro lado, a atividade anti-inflamatória da surfactina foi comprovada tanto *in vivo* quanto *in vitro* e deve-se à inibição direta e seletiva da Fosfolipase A2 citosólica (PLA2), enzima lipolítica que hidrolisa fosfolípidios de membrana, liberando, na presença de  $Ca^{+2}$ , ácido araquidônico, precursor de mediadores químicos do processo inflamatório, prostaglandinas e leucotrienos (KIM et al., 1997). Por sua vez, a atividade



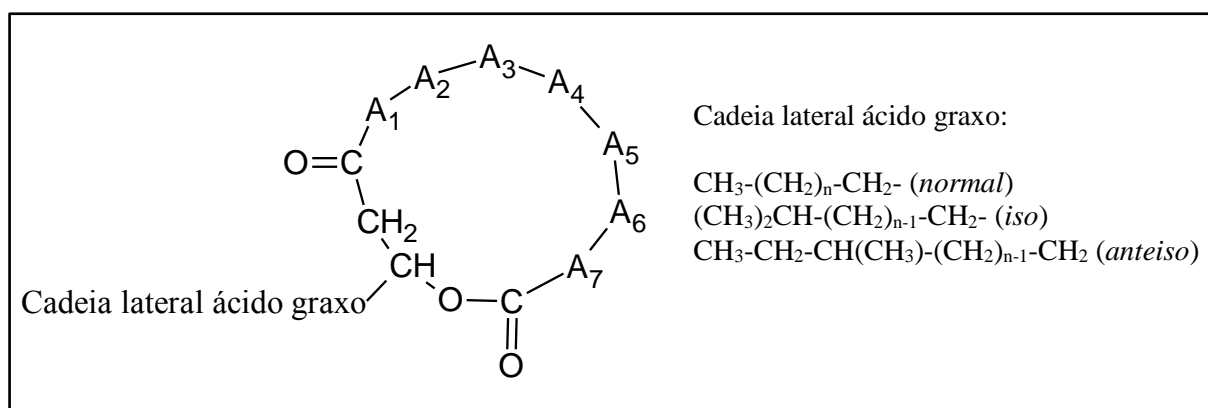
antitumoral contra células do carcinoma de Ehrlich foi relatada por Kameda et al., (1974), no caldo fermentado de *Bacillus natto*, no qual foram encontradas duas substâncias, sendo uma delas, surfactina.

A crescente descoberta de propriedades interessantes com aplicações nas áreas da medicina e biotecnologia promoveu o interesse em pesquisa por surfactina e como resultado, uma grande variedade de isoformas e homólogos deste lipopeptídeos já foram encontrados. Dependendo da composição do meio, a surfactina ocorre como um conjunto de variantes, chamados isoformas, que se diferenciam pela composição de aminoácidos da porção peptídica (ULLRICH et al., 1991). Sendo a família da surfactina composta por aproximadamente 38 diferentes tipos de lipopeptídeos (BONMATIN et al. 2003) divididas em 7 isoformas: bamilocina A, esperina, lichenisina, pumilacidina, [Ala<sup>4</sup>] surfactina, [Leu<sup>4</sup>] surfactina, [Ile<sup>4</sup>] surfactina e as surfactinas A, B e C (Tabela 2).

Embora outros lipopeptídeos tenham surgido, a surfactina continua sendo o principal representante e mais conhecido membro desta família (PEYPOUX, 1999). A principal isoforma, surfactina A (Leu<sup>7</sup> – surfactina), que constitui esta estrutura é formado por um resíduo L-leucina com C-terminal do aminoácido ligado através de uma ligação éster ao ácido graxo β-hidroxilado, sendo chamado quimicamente de ácido 3-hidroxi-13-metil-tetradecanoico, como ilustrado na figura 2 (VATER et al., 2002; LIU et al., 2008). Os isômeros diferem-se através do número de carbono na cadeia lipídica, que pode variar de 12 a 16 átomos, comumente compostos pelos tipos, *n*, *iso* e *anteiso* (Esquema 2) bem como, da composição da parte peptídica (LIU et al., 2008; ZHANG et al., 2013). As isoformas da surfactina A, B e C variam na posição do sétimo aminoácido, entre Leu (surfactina A), Val (surfactina B) e Ile (surfactina C) (Figura 2) e a proporção da produção destas irá depender da linhagem utilizada e das condições de cultivos (LIU et al. 2012). A porção peptídica da surfactina inclui dois resíduos ácidos (aspargina e glutamina) e

cinco resíduos hidrofóbicos (quatro leucinas e uma valina) com sequência quiral LLDLLDL (Tabela 2).

O grupo de surfactinas melhor caracterizado apresenta valores de razão massa/carga entre 1000 e 1060 (KIM et al., 2009). O enorme interesse em torno das propriedades da surfactina vem promovendo o surgimento de inúmeras pesquisas em busca de novas isoformas desta molécula, que apresentem aumento das propriedades biosurfactantes. Como resultado, inúmeras variantes de surfactina tem sido citada (SONG et al., 2009; KIM et al., 2009; LIU et al., 2008).

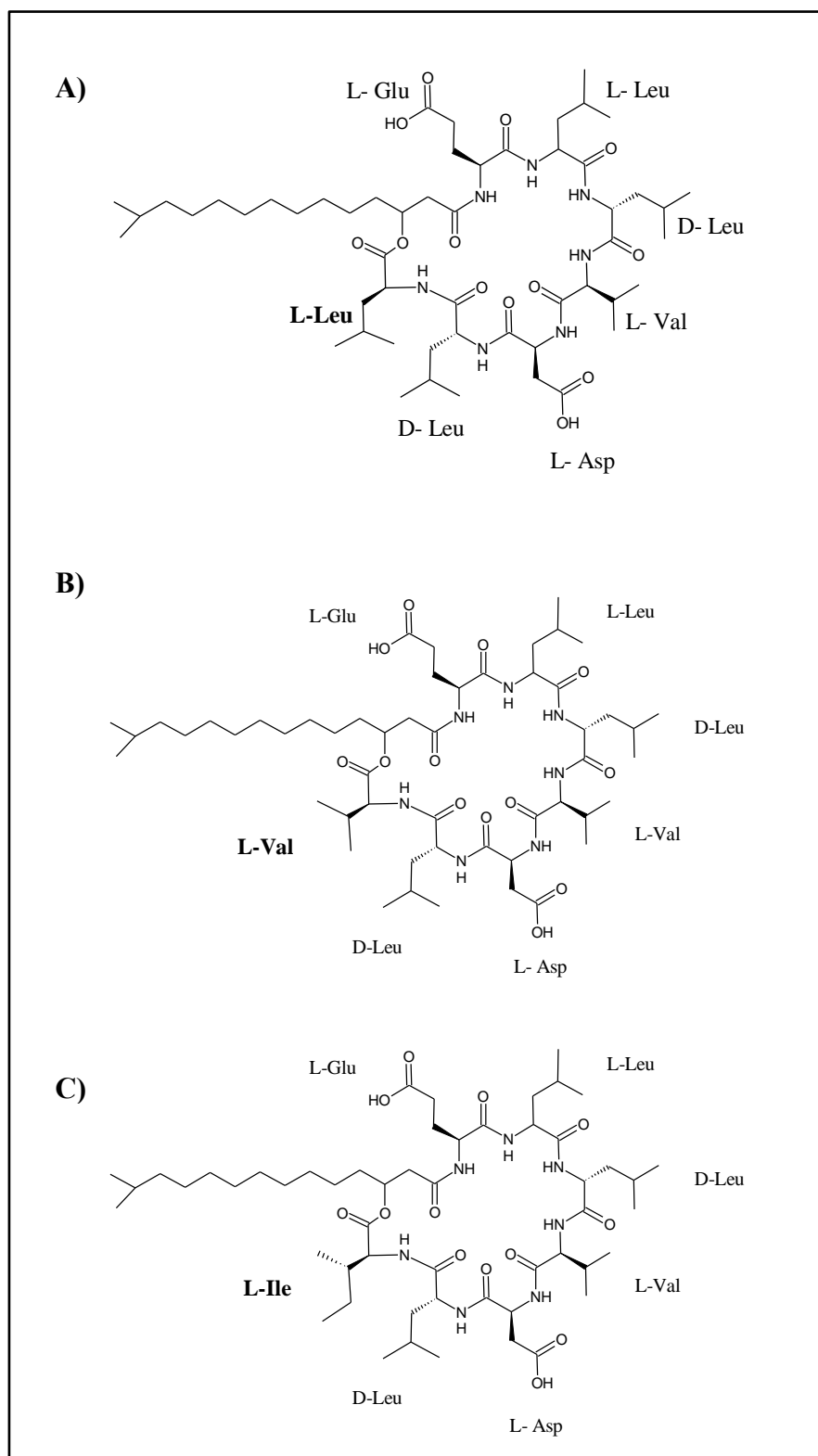


**Esquema 2.** Representação da cadeia lateral ácido graxo da surfactina para *n*, *iso* e *anteiso*.

**Tabela 2.** Sequência peptídica e principais cadeias de ácidos graxos para os lipopeptídeos da família da surfactina.

NOME	SEQUÊNCIA PEPTÍDICA	PRINCIPAIS CADEIAS DE ÁCIDOS GRAXOS	REFERÊNCIAS
Família da Surfactina	Heptapeptídeos cíclico com um anel de lactona com o grupo $\beta$ -OH ligado a cadeia de ácido graxo		
Surfactina A	L-Glu <sup>1</sup> -L-Leu <sup>2</sup> -D-Leu <sup>3</sup> -L-Val <sup>4</sup> -L-Asp <sup>5</sup> -D-Leu <sup>6</sup> -L-Leu <sup>7</sup>	C <sub>12</sub> , C <sub>13</sub> , <i>i</i> C <sub>14</sub> , <i>n</i> C <sub>14</sub> , <i>i</i> C <sub>15</sub> , <i>a</i> C <sub>15</sub> , C <sub>16</sub>	PEYPOUX et al., 1999; BONMATIN et al., 1995; PECCI et al., 2010
Surfactina B	L-Glu <sup>1</sup> -L-Leu <sup>2</sup> -D-Leu <sup>3</sup> -L-Val <sup>4</sup> -L-Asp <sup>5</sup> -D-Leu <sup>6</sup> -L-Val <sup>7</sup>	<i>i</i> C <sub>14</sub> , <i>n</i> C <sub>14</sub> , <i>i</i> C <sub>15</sub> , <i>a</i> C <sub>15</sub>	PEYPOUX et al., 1999
Surfactina C	L-Glu <sup>1</sup> -L-Leu <sup>2</sup> -D-Leu <sup>3</sup> -L-Val <sup>4</sup> -L-Asp <sup>5</sup> -D-Leu <sup>6</sup> -L-Ile <sup>7</sup>	<i>i</i> C <sub>14</sub> , <i>n</i> C <sub>14</sub> , <i>i</i> C <sub>15</sub> , <i>a</i> C <sub>15</sub>	PEYPOUX et al., 1999
[Ala <sup>4</sup> ] surfactina	L-Glu <sup>1</sup> -L-Leu <sup>2</sup> -D-Leu <sup>3</sup> -L-Ala <sup>4</sup> -L-Asp <sup>5</sup> -D-Leu <sup>6</sup> -L-Leu <sup>7</sup>	<i>i</i> C <sub>14</sub> , <i>n</i> C <sub>14</sub> , <i>i</i> C <sub>15</sub> , <i>a</i> C <sub>15</sub>	BONMATIN et al., 2003
[Leu <sup>4</sup> ] surfactina	L-Glu <sup>1</sup> -L-Leu <sup>2</sup> -D-Leu <sup>3</sup> -L-Leu <sup>4</sup> -L-Asp <sup>5</sup> -D-Leu <sup>6</sup> -L-Leu <sup>7</sup>	<i>i</i> C <sub>15</sub>	BONMATIN et al., 2003
[Ile <sup>4</sup> ] surfactina	L-Glu <sup>1</sup> -L-Leu <sup>2</sup> -D-Leu <sup>3</sup> -L-Ile <sup>4</sup> -L-Asp <sup>5</sup> -D-Leu <sup>6</sup> -L-Ile <sup>7</sup>	<i>a</i> C <sub>15</sub>	BONMATIN et al., 2003
Bamilocina A <sup>a</sup>	Glu <sup>1</sup> -Leu <sup>2</sup> -Met-Leu <sup>3</sup> -Prol <sup>4</sup> -Leu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Leu <sup>7</sup>	C <sub>13</sub>	LEE et al., 2007
Esperina <sup>b</sup>	L-Glu <sup>1</sup> -L-Leu <sup>2</sup> -D-Leu <sup>3</sup> -L-Val <sup>4</sup> -L-Asp <sup>5</sup> -D-Leu <sup>6</sup> -L-Leu/Val <sup>7</sup> -COOH	C <sub>13</sub> , C <sub>14</sub> , <i>n</i> C <sub>15</sub>	THOMAS e ITO, 1969
[Val <sup>7</sup> ] Lichenisina	L-Gln <sup>1</sup> -L-Leu/Ile <sup>2</sup> -D-Leu <sup>3</sup> -L-Val <sup>4</sup> -L-Asp <sup>5</sup> -D-Leu <sup>6</sup> -L-Val <sup>7</sup>	<i>i</i> C <sub>13</sub> , <i>a</i> C <sub>13</sub> , <i>n</i> C <sub>14</sub> , <i>i</i> C <sub>15</sub> , <i>a</i> C <sub>15</sub>	BONMATIN et al., 2003; LIN et al., 1994
[Ile <sup>4</sup> ] Lichenisina	L-Gln <sup>1</sup> -L-Leu <sup>2</sup> -D-Leu <sup>3</sup> -L-Ile <sup>4</sup> -L-Asp <sup>5</sup> -D-Leu <sup>6</sup> -L-Ile <sup>7</sup>	<i>a</i> C <sub>15</sub>	BONMATIN et al., 2003; LIN et al., 1994
[Ile <sup>2,4</sup> ] Lichenisina	L-Gln <sup>1</sup> -L-Ile <sup>2</sup> -D-Leu <sup>3</sup> -L-Ile <sup>4</sup> -L-Asp <sup>5</sup> -D-Leu <sup>6</sup> -L-Ile <sup>7</sup>	<i>a</i> C <sub>15</sub>	BONMATIN et al., 2003; LIN et al., 1994
Pumilacidina	L-Glu <sup>1</sup> -L-Leu <sup>2</sup> -D-Leu <sup>3</sup> -L-Leu <sup>4</sup> -L-Asp <sup>5</sup> -D-Leu <sup>6</sup> -L-Val/Ile <sup>7</sup>	<i>a</i> C <sub>15</sub> , <i>i</i> C <sub>15</sub> , <i>n</i> C <sub>16</sub> , <i>i</i> C <sub>16</sub> , <i>a</i> C <sub>17</sub> , <i>i</i> C <sub>17</sub>	NARUSE et al., 1990

<sup>a</sup>As formas L e D não estão definidas; <sup>b</sup>O  $\beta$ - carboxil da Asp<sup>5</sup> está conectado no anel lactona.



**Figura 2.** Estrutura do principal homólogo da surfactina, o ácido 3-hidroxi-13-metil-tetradecanoico (iso-C<sub>15</sub>). Isoformas: **(A)** Surfactina A, **(B)** Surfactina B e **(C)** Surfactina C.

## 2.4.2 Família da Iturina

Iturina A é o composto principal e mais conhecido da família da iturina, que foi isolado de *Bacillus subtilis* a partir de uma amostra de solo, na região de Ituri (Zaire) durante o ano de 1957. O subsequente isolamento a partir de outras estirpes de *B. subtilis* levou a identificação de outros lipopeptídeos. Além da iturina A (Figura 3-A), a literatura realata sete homólogos de iturina que se diferenciam através do comprimento da cadeia carbônica e da presença de cadeias laterais (NORIYASU et al., 2009) como, iturina A<sub>L</sub> e C, micosubtilisina, bacilomicinas D, F, L e Lc (ou bacillopeptina), os quais são inseridos no grupo da Iturina (Tabela 3) (Bonmatin, 2003).

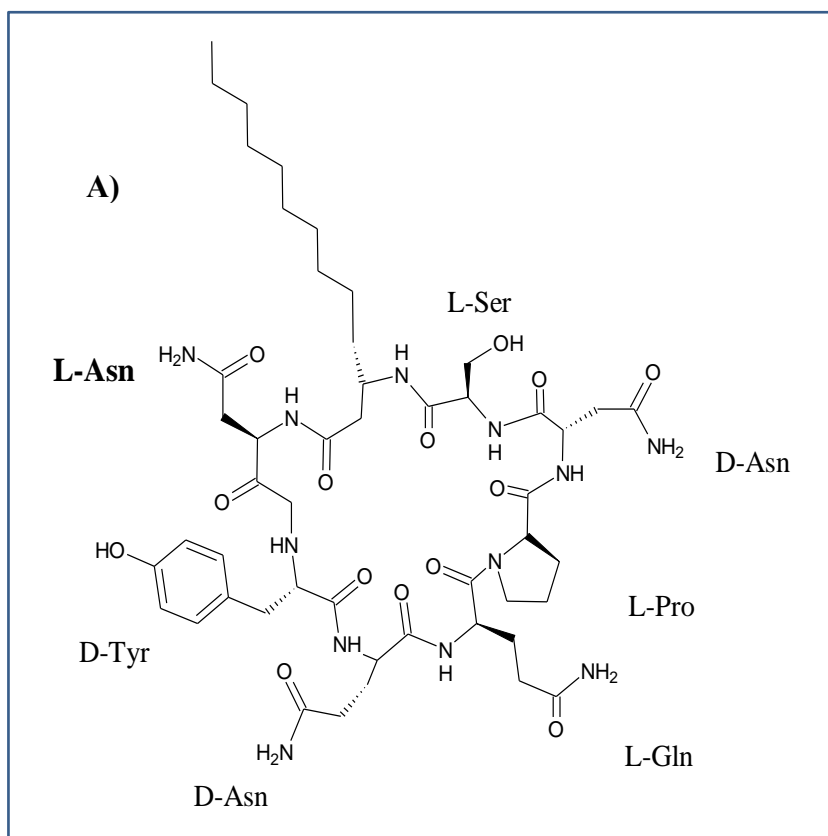
**Tabela 3.** Sequência peptídica e principais cadeias de ácidos graxos para os lipopeptídeos da família da Iturina.

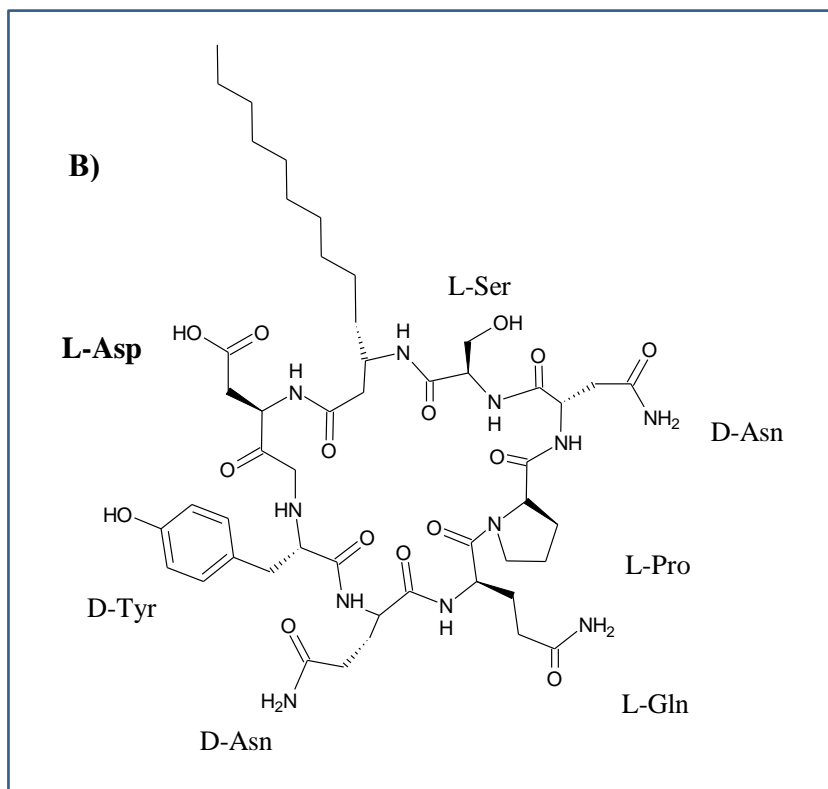
Família da Iturina	Resíduos de aminoácidos							Principais cadeias de ácido graxos
	L	D	D	L	L	D	L	β-amino ácido
<b>Iturina A</b>	<b>Asn</b>	<b>Tyr</b>	<b>Asn</b>	<b>Gln</b>	<b>Pro</b>	<b>Asn</b>	<b>Ser</b>	<i>n</i> -C <sub>14</sub> , <i>i</i> -C <sub>15</sub> , <i>a</i> -C <sub>15</sub>
Iturina A <sub>L</sub>	<b>Asn</b>	<b>Tyr</b>	<b>Asn</b>	<b>Gln</b>	<b>Pro</b>	<b>Asn</b>	<b>Ser</b>	<i>n</i> -C <sub>16</sub> , <i>i</i> -C <sub>16</sub>
<b>Iturina C</b>	<b>Asp</b>	<b>Tyr</b>	<b>Asn</b>	<b>Gln</b>	<b>Pro</b>	<b>Asn</b>	<b>Ser</b>	<i>n</i> -C <sub>14</sub> , <i>i</i> -C <sub>15</sub> , <i>a</i> -C <sub>15</sub>
Micosubtilina	<b>Asn</b>	<b>Tyr</b>	<b>Asn</b>	<b>Pro</b>	<b>Pro</b>	<b>Ser</b>	<b>Asn</b>	<i>i</i> -C <sub>16</sub> , <i>a</i> -C <sub>17</sub>
Bacilomicina D	<b>Asn</b>	<b>Tyr</b>	<b>Asn</b>	<b>Gln</b>	<b>Glu</b>	<b>Ser</b>	<b>Thr</b>	<i>n</i> -C <sub>14</sub> , <i>i</i> -C <sub>15</sub> , <i>a</i> -C <sub>15</sub>
Bacilomicina F	<b>Asn</b>	<b>Tyr</b>	<b>Asn</b>	<b>Pro</b>	<b>Pro</b>	<b>Asn</b>	<b>Thr</b>	<i>i</i> -C <sub>16</sub> , <i>a</i> -C <sub>17</sub> , <i>i</i> -C <sub>17</sub>
Bacilomicina L	<b>Asp</b>	<b>Tyr</b>	<b>Asn</b>	<b>Gln</b>	<b>Gln</b>	<b>Ser</b>	<b>Thr</b>	<i>n</i> -C <sub>14</sub> , <i>i</i> -C <sub>15</sub> , <i>a</i> -C <sub>15</sub>

Fonte: Adaptado de Jacques, 2011.

O esqueleto químico desta família também é lipo-heptapeptídicos assim como as surfactinas, mas com sequência peptídica diferente (Tabela 3). Estes compostos são lipopeptídeos neutros ou monoaniônicos. Todos os compostos têm: a mesma sequência quiral LDDLLDL, com um número restrito de resíduos: Asx, Tyr, Asn, Gln/Pro, Pro/Glx,

Asn/Ser, Ser/Asn/Thr, e possuem ligação  $\beta$ -amino ácido. As iturinas contém uma mistura de isômeros de ácido iturínico variando entre 13 a 17 átomos de carbono (VATER et al., 2002; ONGENA et al., 2007; ROMERO et al., 2007) com configurações *n*, *iso* e *anteiso* (BONMATIN, 2003). Estes lipopeptídeos destacam-se por apresentar elevada ação antifúngica, devido à ação sobre a membrana citoplasmática da célula alvo, que tem sua permeabilidade de íon alterada, permitindo a saída de íons  $K^+$ , resultando em morte celular e atividade antibiótica (ALVAREZ et al., 2012; HSYEH et al., 2008; MAGET-DANA et al., 1992). Esta família apresenta semelhanças à surfactina, com um forte caráter anfipático (referente a moléculas que contêm porções hidrofílica e hidrofóbica), sendo essa a razão da sua comprovada atividade sobre as membranas celulares. Além disso, possui um amplo espectro de ação e baixa toxicidade como antifúngico (GRAU et al., 2001).





**Figura 3.** Estrutura do principal homólogo ( $n$ -C<sub>13</sub>) da iturina. Isoforma: **(A)** Iturina A, **(B)** Iturina C.

A ação conjunta da iturina e da surfactina contra fitopatógenos foi comprovada pela comparação *in vitro* de duas linhagens de *Bacillus*. Nos metabólitos produzidos por *B. subtilis* RB14, mostrou melhor atividade inibitória contra diversos fitopatógenos do que o *B. subtilis* NB22, devido à produção simultânea dessas substâncias (OHNO et al., 1995).

### 2.4.3 Família da Fengicina

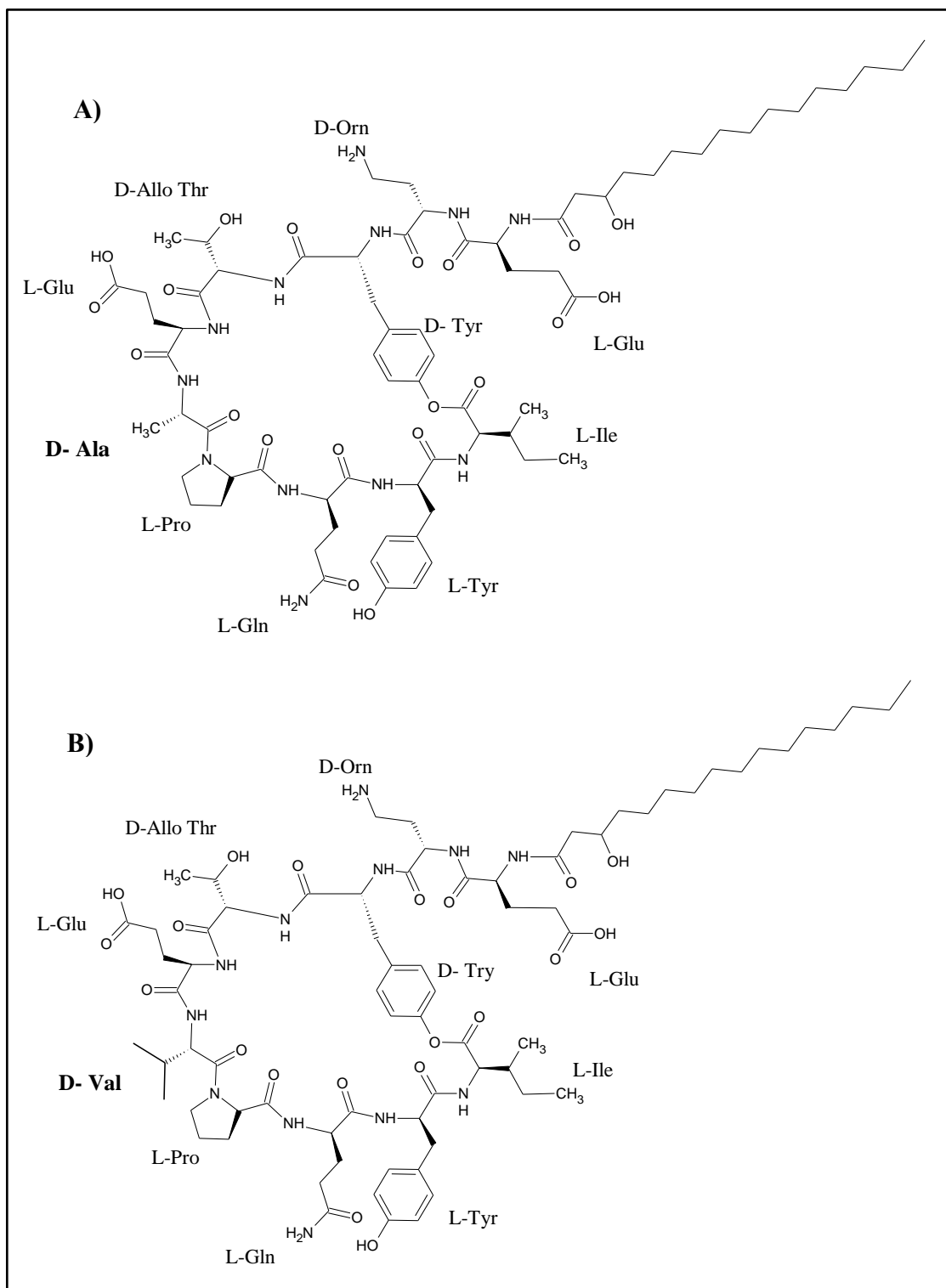
Essa família de lipopeptídeos inclui as isoformas da fengicina A, B e plipastatina, que é composta por um ácido graxo  $\beta$ -hidroxilado ligado a uma porção peptídica de 10 aminoácidos que mostram propriedades incomuns, como a presença de ornitina na porção peptídica. A cadeia lipídica pode variar de 13 a 18 átomos de carbono, distribuídos nas formas *n*, *iso*, *anteiso*, podendo ser saturado ou insaturado. As fengicinas consistem de

duas principais isoformas que diferem na posição 6 da cadeia peptídica pela troca de um aminoácido. A fengicina A (Figura 4) é composta por L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-allo-Thr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile, e na fengicina B, o resíduo de aminoácido D-Ala é substituído por D-Val. Em ambas as isoformas, há uma ligação lactona conectando D-Tyr e L-Ile (ROMERO et al., 2007; ONGENA et al., 2007; VANITTANAKOM et al., 1986; VATER et al., 2002). As fengicinas possuem forte atividade surfactante e antifúngica, embora mais específicas para fungos filamentosos (VANITTANAKOM et al., 1986) mas é ineficaz frente a bactérias e leveduras (ROMERO et al., 2007; ONGENA et al., 2007; VANITTANAKOM et al., 1986; VATER et al., 2002).

**Tabela 4.** Sequência peptídica e principais cadeias de ácidos graxos para os lipopeptídeos da família da fengicina.

Nome	Sequência peptídica	Principais cadeias de ácidos graxos	Referências
<b>Família da Fengicina</b>	<b>Decapeptídeo com um anel de lactona entre o grupo carboxi-terminal de Ile<sub>10</sub> e grupo OH de Tyr.</b>		
Fengicina A	L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-Thr -L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile	<i>aC</i> <sub>15</sub> , <i>iC</i> <sub>16</sub> , <i>nC</i> <sub>16</sub>	SCHNEIDER et al., 1999; JACQUES, 2011
Fengicina B	L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-Thr -L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile	<i>aC</i> <sub>15</sub> , <i>iC</i> <sub>16</sub> , <i>nC</i> <sub>16</sub> , <i>C</i> <sub>17</sub>	SCHNEIDER et al., 1999; JACQUES, 2011
Plipastatina A	L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-Thr -L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-D-Tyr-L-Ile	<i>nC</i> <sub>16</sub> , <i>aC</i> <sub>17</sub>	NISHIKIORI et al., 1986; JACQUES, 2011
Plipastatina B	L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-Thr -L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Gln-D-Tyr-L-Ile	<i>nC</i> <sub>16</sub> , <i>aC</i> <sub>17</sub>	NISHIKIORI et al., 1986; JACQUES, 2011





**Figura 4.** Estrutura do principal homólogo ( $n$ -C<sub>16</sub> da fengicina). Isoformas: **(A)** fengicina A, **(B)** fengicina B.

## 2.5 PEPTÍDEOS SINTETIZADOS PELA VIA NÃO RIBOSSOMAL

Os peptídeos sintetizados pela via não-ribossomal são drasticamente modificados e amplamente produzidos por bactérias (MACHADO et al., 2004). São exemplos os

glicopeptídeos como vancomicina e os lipopeptídeos como surfactina entre outros. A síntese não-ribossômica utiliza uma grande variedade de substratos, como aminoácidos não-proteicos, hidroxiácidos e substâncias policetílicas, especialmente elaboradas para serem incorporadas na estrutura destes peptídeos. No processo biossintético eles podem ser modificados de várias maneiras pelos domínios integrados ou pelas funções codificadas por genes separados, o que propicia uma diversidade enorme de peptídeos lineares ou cíclicos. O tamanho desses peptídeos varia de 2 a 48 aminoácidos (MACHADO et al., 2004).

As moléculas sintetizadas por via não-ribossômica, a partir de uma rota enzimática para a síntese de peptídeos, e que essa se desenrola através de um complexo enzimático modular chamado não-ribossomal peptídeo sintetase (NRPS), normalmente são cíclicas com uma grande quantidade de aminoácidos não proteicos (CHALLIS & NAISMITH, 2004).

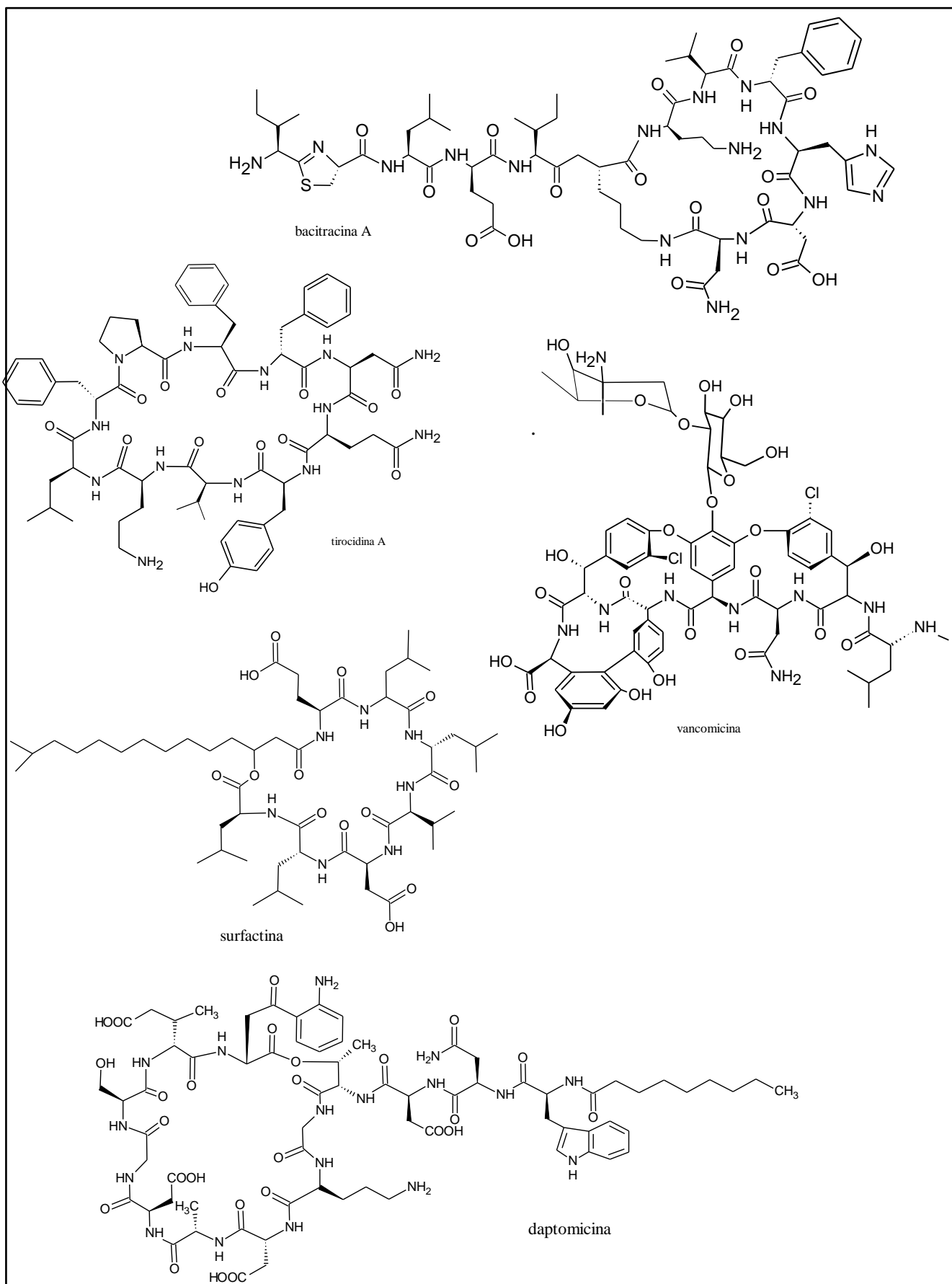
A habilidade destes complexos multienzimáticos de incluir tais aminoácidos e incorporá-los em ambos os peptídeos cíclicos e lineares resulta em grande estrutura natural, diversa das espécies bacterianas e fúngicas. Os peptídeos não-ribossômicos podem atuar como um esqueleto para a biossíntese de estruturas mais complexas ou podem ser incorporados como ácidos graxos ou policetonas. Tais estruturas podem ser biossintetizadas por sistemas de peptídeos sintetase mistos ou híbridos e policetídeo sintase. O número de metabólitos secundários estruturalmente identificados produzidos por este mecanismo de arranjo de tios está se expandindo muito rapidamente (MACHADO et al., 2004).

Os peptídeos produzidos em síntese não-ribossômica são de grande interesse econômico por apresentarem um enorme potencial de atividades biológicas. Os genes que codificam os peptídeos sintetases têm sido clonados de diferentes origens e analisados em

nível molecular (SYMMANK et al., 2002). Dentre os exemplos, podem ser citados o sistema de enzimas para a produção do imunomodulatório ciclosporina A (WEBER et al., 1994) de *Tolypocladium inflatum*, o precursor do antibiótico penicilina (MACCABE et al., 1991) de várias espécies de bactérias e fungos, e o lipopeptídeo surfactina de *Bacillus subtilis* (COSMINA et al., 1996). Muitos destes peptídeos são cíclicos ou ramificados. Assim, segundo Mootz; Schwarzer; Marahiel (2000), NRPS tem a chave para síntese de peptídeos de estrutura complexa, os quais são extremamente difíceis para sintetizar.

Estes peptídeos representam um grupo de produtos naturais, com grande importância farmacêutica, sintetizado por microrganismos, incluindo fungos filamentosos, bactérias Gram-positivas e em menor extensão as Gram-negativas. Entre as bactérias Gram-positivas, o grupo dos *Actinomicetos*, assim como os membros do gênero *Bacillus* são as principais produtoras de NRPSs.

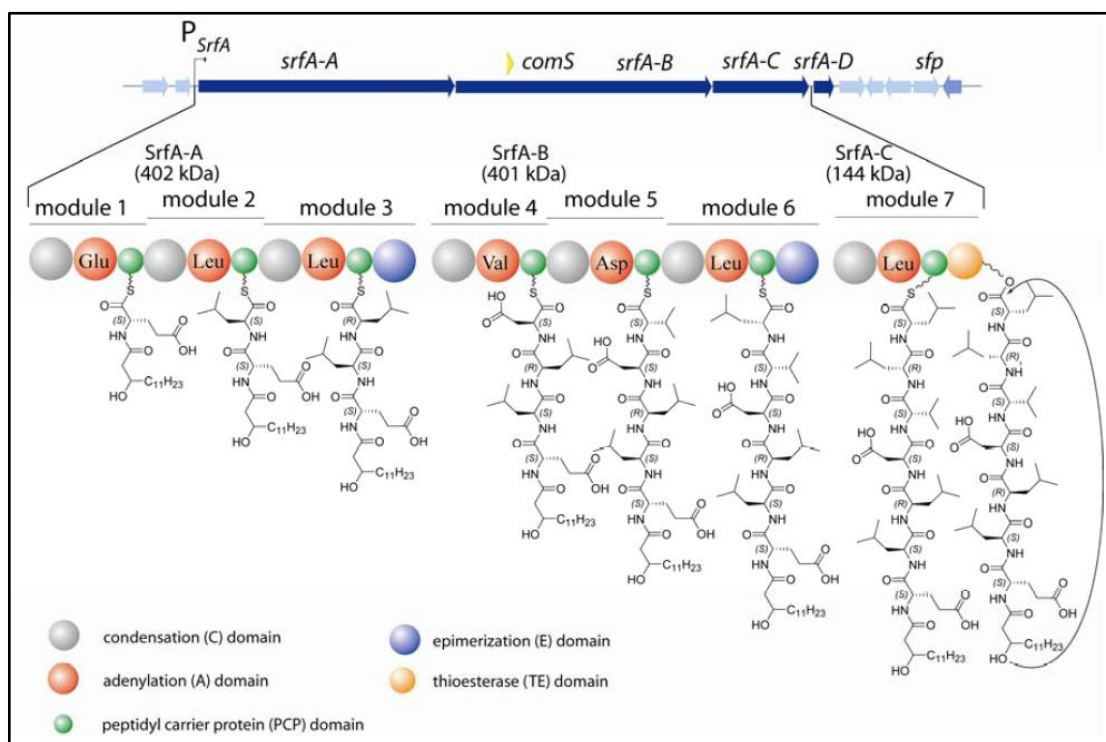
Os membros desta classe heterogênea de compostos naturais compreendem o antibiótico bacitracin A (KONZ & MARAHIEL, 1999), tirocidina A (MOOTZ & MARAHIEL, 1997), vancomicina (VAN WAGENINGEN et al., 1998) e daptomicina (RAJA et al., 2003) bem como o lipopeptídeo surfactina (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999). Sendo também de origem não-ribossômica o imunossupressor ciclosporina A (WEBER et al., 1994) (Figura 5).



**Figura 5.** Classes heterogêneas de compostos naturais sintetizados por NRPS

A complexidade estrutural dos NRPSs reflete seu amplo espectro de atividades. O conjunto multienzimático, responsável pela síntese da surfactina, consiste de três grandes NRPSs: *srfA-A* (402 kDa), *srfA-B* (401 kDa) e *srfA-C* (144 kDa), compreendendo um total de sete módulos. Os genes NRPSs correspondentes são organizados no operon *srfA* (Figura 6).

Imediatamente abaixo da região codificadora de *srfA-C*, está localizado o gene *srfA-D*, sequência que codifica para a thioesterase tipo II (TE II). Aproximadamente 4 kb abaixo do operon *srfA*, está localizado o gene *sfp*, o qual codifica para fosfopanteinase (PPTase), requerida para a conversão do domínio PCP do complexo biossintético da surfactina de sua forma inativa para forma ativa (LAMBALOT et al., 1996). De acordo com Lee et al. (2005), o gene *sfp*, o qual é requerido juntamente com o operon *srfA* para a biossíntese de surfactina (NAKANO et al., 1992), está localizado vários quilobases abaixo do operon *srfA* e codifica uma fosfopanteína transferase (PPTase) necessária para ativar a surfactina sintetase por modificação pós-transcricional.



**Figura 6.** Rota biossintética da surfactina (Fonte: CHIOCCHINI, 2006.)

## **2.6 MICRORGANISMOS MAIS COMUMENTE UTILIZADOS EM TESTES ANTIMICROBIANOS**

Dentre os vários microrganismos utilizados em testes antimicrobianos, pode-se ressaltar, pela importância epidemiológica, as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente. Entretanto, outros microrganismos também são de interesse na área científica como o fungo leveduriforme *Candida albicans*, as bactérias Gram-positivas não patogênicas *Bacillus sp* e *Bacillus subtilis* (SOUZA et al., 2004), o fungo filamentosso, fitopatogênico *Trichoderma sp* (SANTOS et. al., 2012) entre outros.

### **2.6.1 *Staphylococcus aureus***

O *Staphylococcus aureus* (Figura 7- a) é considerado o principal agente etiológico de infecções nosocomiais e comunitárias. Esta bactéria, pertencente ao grupo dos cocos Gram-positivos, pode ser facilmente encontrada na pele e nas fossas nasais de indivíduos saudáveis (SANTOS, 2007). As doenças provocadas pelo *S. aureus* vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia, entre outras) (SANTOS, 2007), sendo que a maioria delas é proveniente de fonte endógena (PERL et al, 2002 *apud* CAVALCANTI *et al.*, 2006).

### **2.6.2 *Enterococcus faecalis***

Os enterococos são cocos Gram-positivos que geralmente se dispõem aos pares e em curtas cadeias e são catalase negativos (MURRAY et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2003). Os enterococos são microrganismos que atuam como patógenos oportunistas em humanos e que frequentemente causam infecções em pacientes hospitalizados. O principal reservatório humano de *E. faecalis* (Figura 7- b) é o trato gastrointestinal, porém pode ser encontrado, embora com menos frequência, em cavidade oral, vesícula biliar,

vagina e uretra masculina (HORNER et al., 2005). Também podem ser encontrados no solo, em alimentos, na água, em animais, pássaros e insetos (TEIXEIRA et al., 2003). Tornaram-se, porém, importantes agentes de doenças humanas devido principalmente à sua resistência a agentes antimicrobianos (HORNER et al., 2005).

### **2.6.3 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* (Figura 7-c) é um bacilo Gram-negativo da família *Enterobacteriaceae*, utilizado como indicador de contaminação fecal em alimentos, por pertencer à microbiota normal do trato entérico do homem (RODRIGUES et al., 2008).

Do ponto de vista de suas relações com o homem, podem-se distinguir dois grandes grupos de amostras. O primeiro, chamado *E. coli* comensal, habita o intestino humano desde o nascimento até a morte. O segundo, denominado *E. coli* patogênica, pode causar diferentes tipos de infecção e é constituído por vários patótipos. A *E. coli* comensal difere evolutivamente da *E. coli* patogênica e não apresenta, em seu genoma, os genes que codificam os fatores de virulência presentes nos diferentes patótipos (FOCACCIA, 2005).

A *E. coli* associada às infecções intestinais, conhecida por DEC (Diarreiogenic *Escherichia coli*), são divididas em seis patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (FOCACCIA, 2005; MURRAY et al., 2000; TRABULSI, 2002).

*E. coli* enteropatogênicas (EPEC) são a maior causa de diarreia em crianças com idade inferior a um ano nos países em desenvolvimento. Atualmente são divididas em EPECs típicas e atípicas. Dentre os vários sorotipos de EPEC, os que predominam no meio brasileiro são O:111: H2, O:119: H6, O:55: H6 e O:86: H34 (FOCACCIA, 2005).

O mecanismo patogênico envolve adesão à membrana plasmática dos enterócitos causando destruição das microvilosidades adjacentes. A diarreia resulta da perda das propriedades absorptivas das células infectadas, caracterizando-se pela presença de muco abundante, sem sangue, acompanhada de dores abdominais, febre, vômitos e desidratação, sendo reconhecida inclusive por causar diarreia crônica.

#### **2.6.4 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* (Figura 7- d) é um organismo Gram-negativo aeróbico e ubíquo, que dificilmente causa doenças em pessoas saudáveis (HANCOCK & SPEERT, 2000), porém é uma das principais espécies bacterianas que ocasionam infecções em pacientes hospitalizados (GOLDBER, 2010).

Na América Latina, *P. aeruginosa* ssp. é responsável por 7,5% das infecções de corrente sanguínea, por 31,2% dos casos de pneumonia e por 13,8% das infecções da pele e dos tecidos moles (GALES et al., 2012).

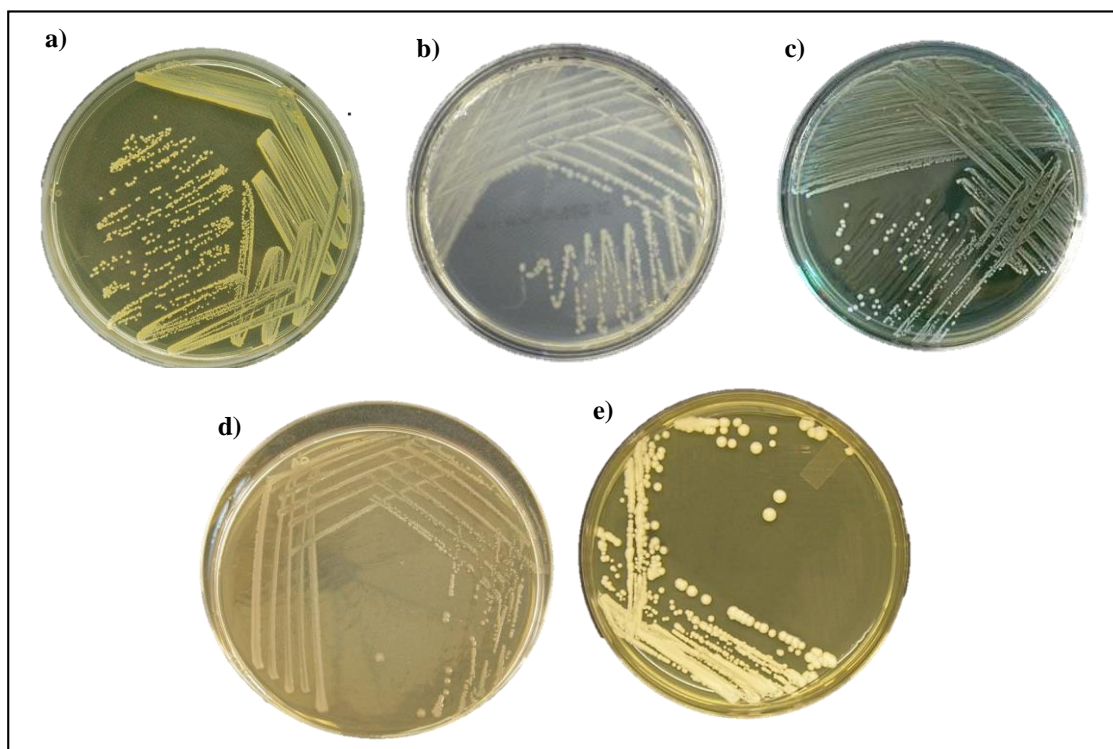
Sua importância se deve pela expressão de múltiplos mecanismos de resistência, dificultando a ação de antibacterianos, ocasionando elevados índices de morbidade e mortalidade (GALES et al., 2004; LAMBERT et al., 2011).

#### **2.6.5 *Candida albicans***

A *Candida* (Figura 7- e) é um fungo diploide e polimórfico responsável pelo desenvolvimento de várias patologias (LIMA et al., 2004). Em condições normais, este fungo está presente nos humanos sem que isso implique em quaisquer efeitos prejudiciais à sua saúde (CARDOSO, 2004). Entre 25 a 75% dos indivíduos saudáveis podem apresentar *Candida* spp. (WILLIAMS et al., 1997). Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização na mucosa vaginal, sendo *Candida albicans* a espécie prevalente (OLIVEIRA et al., 1993; VAL & ALMEIDA FILHO, 2001). Podem colonizar a cavidade



oral, trato gastrointestinal, respiratório e urinário, além da circulação sanguínea. A candidíase manifesta-se quando fatores predisponentes, fisiológicos, patológicos e mecânicos modificam o relacionamento que ocorre entre o hospedeiro e a microbiota natural. Neste caso, a candidíase pode ser localizada, determinando sintomatologia restrita a essa área, ou sistêmica e fatal (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; PFALLER & DIEKEMA, 2007; JOUAULT et al., 2009). Segundo Colombo & Guimarães (2003) a candidíase pode ainda se manifestar em locais diferentes do corpo, incluindo órgãos como rins, fígado, baço e cérebro.



**Figura 7. Microrganismos utilizados para fins científicos:** (a) *Staphylococcus aureus*, (b) *Enterococcus faecalis*, (c) *Escherichia coli*, (d) *Pseudomonas aeruginosa* e (e) *Candida albicans*.

Fonte: <sup>a</sup><http://lib.jiangnan.edu.cn/asm/078> acesso em 16/08/15;

<sup>b</sup><http://www.floriental.org/293186-enterococcus-faecalis-on-agar> acesso em 17/08/15;

<sup>c</sup><http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xec/xec03-04.html> acesso em 17/08/15;

<sup>d</sup><http://www.geniebio.ac-aix-marseille.fr/biospip/spip/> - acesso em 16/08/15 e

<sup>e</sup><http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com.br/2009/12/candida-albicans.html> acesso em 17/08/15.

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1 GERAL**

Contribuir para o conhecimento químico e biológico de bactérias endofíticas amazônicas produtoras de lipopeptídeos, através da análise por ESI-ITMS<sup>2</sup> e ensaios biológicos em busca de novas substâncias com potencial antibiótico.

### **3.2 ESPECÍFICOS**

- Selecionar, por ensaios preliminares, bactérias endofíticas produtoras de lipopeptídeos, cedidas pelo laboratório de Genética Aplicada à Saúde e à Biotecnologia da ESA/UEA;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das bactérias selecionadas, pela metodologia de Christensen;
- Analisar, por ESI-ITMS<sup>2</sup>, o líquido fermentado das linhagens de bactérias selecionadas para confirmar a produção de lipopeptídeos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos lipopeptídicos pelo bioensaio por difusão em ágar;
- Caracterizar quimicamente os lipopeptídeos dessas linhagens.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 4.1 LINHAGENS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS SELECIONADAS

Ensaio preliminares de coloração por Sudan Black (SB), um ensaio tipicamente utilizado para a seleção de bactérias produtoras de PHAs (Polihidroxicanoatos), seguidos de análises por espectrometria de massas indicaram que diversas linhagens com resultados positivos nesse ensaio eram produtoras de lipopeptídeos. Desta forma, foram selecionadas 50 linhagens de bactérias endofíticas isoladas de plantas e uma de solo da Amazônia com resultado positivo para SB, todas pertencentes à coleção do laboratório de Genética Aplicada a Saúde e a Biotecnologia da ESA/ UEA (Tabela 5).

**Tabela 5.** Bactérias endofíticas isoladas de plantas e uma de solo da Amazônia.

Nº	Código de Identificação	Planta de referência
1	17 Gh Cc3 1.2 a	Casca do caule de <i>Gustavia hexapetala</i>
2	39 GhCr3 2.1.1	Casca da raiz de <i>G. hexapetala</i>
3	41 Gh F1 1.2 bBB	Folha de <i>G. hexapétala</i>
4	42 GhCr3 1.1 <sup>a</sup>	Casca da raiz de <i>G. hexapetala</i>
5	47 GhCg1 2.2b	Casca do galho de <i>G. hexapetala</i>
6	48 GhCc1 1.2d	Casca do caule de <i>G. hexapetala</i>
7	50 GhCc1 2.1 <sup>a</sup>	Casca do caule de <i>G. hexapetala</i>
8	54 Caule aveia + CT 1.4.1 <sup>a</sup>	Caule de <i>Macrófita</i> aquática 01
9	56 Caule BDA + CT 1.1.1B	Caule de <i>Macrófita</i> aquática 01
10	59 Caule BDA + CT 1.1.1 <sup>a</sup>	Caule de <i>Macrófita</i> aquática 01
11	63 BDA + CT Flor 2.4.1	Flor de <i>Macrófita</i> aquática 02
12	64 BDA + CT Folha 2.4.1	Folha de <i>Macrófita</i> aquática 02
13	65 Folha BDA 1.3.1	Folha de <i>Macrófita</i> aquática 01
14	66 Flor 1.1.3b1	Flor de <i>Macrófita</i> aquática 01
15	67 ISP2 + CT Folha 1.1.3	Folha de <i>Macrófita</i> aquática 01
16	68 MaO6 Caita 2.2.3	Caule da <i>Macrófita</i> aquática 06
17	73 BDA Caule 1.2.1	Caule <i>Macrófita</i> aquática 01
18	76 Folha BDA 1.3.1a	Folha <i>Macrófita</i> aquática 01
19	81 Caule aveia 1.2.2	Caule <i>Macrófita</i> aquática 01
20	82 Folha aveia 1.4.1	Folha <i>Macrófita</i> aquática 01
21	84 Folha BDA 1.4.1	Folha <i>Macrófita</i> aquática 01
22	91 MaO6 Caule TG 2.1.3	Caule da <i>Macrófita</i> aquática 06
23	105 DgC2 1.1 s/asep.	Caule de <i>Duguetia stelechantha</i>

24	108	DgG1 1.3b	Galho de <i>D. stelechantha</i>
25	109	DgCc1 2.1	Casca do caule de <i>D. stechantha</i>
26	127	DgC1 3.3b s/ assep.	Caule de <i>D. stelechantha</i>
27	148	Stsp Cr2 3.3.1c	Casca da raiz de <i>Strychnos</i> sp
28	156	Stsp R2 1.3	Raiz de <i>Strychnos</i> sp
29	158	Stsp R1 1.1	Raiz de <i>Strychnos</i> sp
30	164	Ppc12.2b	Caule de <i>Pothomorpha peltata</i>
31	174	DgCr 1.2.3	Casca da raiz de <i>Duguetia stel.</i>
32	181	DgR1 2.2	Raiz de <i>D. stelechantha</i>
33	185	DgR2 1.2	Raiz de <i>D. stelechantha</i>
34	189	DgFr1 2.3c	Fruto de <i>D. stelechantha</i>
35	191	DgFr1 2.3b	Fruto de <i>D. stelechantha</i>
36	196	DgCr2 1.1b	Casca da raiz de <i>D. stelechantha</i>
37	207	AnspR1 1.3	Raiz de <i>Rollinia</i> sp
38	222	AnspCr1 2.2c	Casca da raiz de <i>Rollinia</i> sp
39	223	AnspCg2 1.3	Casca do galho de <i>Rollinia</i> sp
40	224	Ansp C2 2.1c	Caule de <i>Rollinia</i> sp
41	229	Dfga 1.1.2	Galho de <i>Duguetia flagelares</i>
42	234	Dffg 1.1.2b	Flagelo de <i>D. flagelares</i>
43	239	Cosp R2 13 la7.B Ac	Raiz de <i>Bryophyllum pinnatum</i>
44	243	Cosp R3 Bac. ac	Raiz de <i>B. Pinnatum</i>
45	254	Cosp H BDA 2 Ac	Haste de <i>B. Pinnatum</i>
46	257	Cosp R2 Bac. ac	Raiz de <i>B. Pinnatum</i>
47	258	Cosp H BDA ac	Haste de <i>B. Pinnatum</i>
48	259	Cosp R2 3.3 Cito	Raiz de <i>B. Pinnatum</i>
49	264	Cosp H Bac. Ac	Haste de <i>B. Pinnatum</i>
50	265	Bactéria 2 solo 4	Solo, ponto 4 da ESA/UEA.

## 4.2 MATERIAIS E MEIO DE CULTURA

### 4.2.1 Meio de cultivo para a fermentação

Para a fermentação das bactérias endofíticas e a de solo foi utilizado o meio de cultura YM (“*Yeast-Malt*”), com a seguinte composição, em g/L: sacarose = 20; peptona = 9; extrato de levedura = 2,7; extrato de malte = 2,7; pH = 6,5.

#### **4.2.2 Meio de cultivo para o crescimento dos microrganismos teste**

Para a realização dos testes biológicos, os patógenos foram reativados, para as bactérias, nos meios de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) (extrato BHI = 10; dextrose = 4; ágar power = 15)\*; e no meio MH (*Müller Hinton*) (extrato MH = 10; dextrose = 4; ágar power = 15)\*. Para a levedura utilizou-se o meio Sabouraud (extrato de Saboraud = 10; dextrose = 4; ágar power = 15)\*. As bactérias endofíticas e a de solo foram reativadas, utilizando o meio de cultura ISP2 (amido = 10; glicose = 4; extrato de malte = 10; extrato de levedura = 4; ágar power = 15)\*.

Para o ensaio de difusão em ágar, os meios utilizados para o crescimento dos patógenos foram os mesmos descritos acima, porém em meio líquido.

#### **4.2.3 Esterilização dos meios e equipamentos**

Para garantir as condições estéreis, os meios de cultivos e os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 15 minutos, antes do início de qualquer procedimento.

### **4.3 EQUIPAMENTOS DE ANÁLISES**

#### **4.3.1 Seleção das linhagens produtoras de lipopeptídeos por ESI-ITMS**

As análises dos metabólitos extracelulares produzidos pelas linhagens das bactérias endofíticas foram realizadas no aparelho de espectrometria de massas marca *Thermo Fisher*, modelo *ion trap (LCQ Fleet)* equipado com fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) nos modos positivos e negativos. Os parâmetros da fonte ESI foram as seguintes: voltagens do capilar e da fonte foram, respectivamente 23 V e 4,95 kV, no modo positivo e -20 V e 4,95 kV no modo negativo. As taxas de fluxo dos gases (hélio) auxiliar e de bainha variaram de 11 a 13% para os dois modos de ionização. Temperatura do capilar

---

\*composição em g/L

foi de 219 °C e Tube lens à 114 V no modo positivo e -110 V no modo negativo, na região de  $m/z$  200-2000.

#### **4.3.2 Análises das amostras de lipopeptídeos em equipamento de baixa resolução**

As análises dos extratos lipopeptídicos foram realizadas no aparelho de espectrometria de massas marca *Thermo Fisher*, modelo *ion trap (LCQ Fleet)* equipado com fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) no modo positivo. Os parâmetros da fonte ESI foram os seguintes: voltagens do capilar e da fonte foram, respectivamente 24 V e 4,95 kV. Taxas de fluxo dos gases (hélio) auxiliar, 13%; temperatura do capilar, 260° C; Tube lens à 115V. O MS e MS/MS foram adquiridos na gama de 200-2000  $m/z$ .

#### **4.3.3 Análises das amostras de lipopeptídeos em equipamento de alta resolução**

Os extratos lipopeptídicos também foram analisados no aparelho de espectrometria de massa modelo 6550 iFunnel LC-MS (Agilent) acoplado ao analisador de massa quadrupolo *time-of-flight* (QTOF) equipado com uma fonte de *eletrospray* (ESI) no modo negativo. Os parâmetros da fonte ESI foram as seguintes: voltagem do capilar, 3500 V; tensão bocal, 0; Fragmentor, 100; Skimmer, 65; temperatura do gás (Argônio) 280 °C; fluxo do gás 14 L/min e nebulizador, 45 psi. O MS e MS/MS foram adquiridos na gama de 50-2000  $m/z$ .

### **4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

#### **4.4.1 Pré-inóculo e condições de cultivo**

A inoculação das bactérias foi realizada em meio líquido YM. Aproximadamente 24 h antes de dar início ao ensaio em maior escala, as bactérias passavam por um processo de pré-inóculo que consistia na adição de 50 µL da suspensão de bactéria em tubos de



ensaio contendo 5 mL de meio líquido YM estéril. Após este inóculo, os tubos foram incubados a 26 °C por aproximadamente 24 h ou até obter uma turvação correspondente a 2 da escala de McFarland. Depois que cada pré-inóculo alcançava a turbidez desejada, dava-se início ao ensaio em maior escala. Assim, com auxílio de uma pipeta graduada, foi retirado 1 mL desse pré-inóculo e adicionado em erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio líquido YM esterilizados. Em seguida, foram incubados sob agitação a 120 rpm à temperatura de 26 °C por 72 h correspondente entre 7 a 8 da escala de McFarland. Todo este processo foi realizado em triplicata.

#### **4.4.2 Obtenção do sobrenadante**

Após a obtenção dos meios metabólitos, produzidos pelas bactérias endofíticas, foram transferidos para tubos falcon estéreis de 50 mL.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm a 4 °C por 20 minutos para retirada da massa celular. Logo, os meios líquidos fermentados foram separados do meio celular e transferidos para novos tubos falcon. O líquido fermentado livre de células (sobrenadante) foi filtrado em membrana (0,22 µm) e foram separadas alíquotas de 1 mL em Eppendorfs de 1,5 mL e armazenado a 4 °C. O restante foi mantido a -20 °C para análise por espectrometria de massas (EM), extração e realização dos bioensaios.

#### **4.4.3 Seleção das linhagens produtoras de lipopeptídeos por espectrometria de massas**

As análises de EM (idem 4.3.1) para a seleção das bactérias endofíticas produtoras de lipopeptídeos foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas da Universidade Federal do Amazonas.

As 50 linhagens das bactérias selecionadas (Tabela 5) foram analisadas quanto à produção de lipopetídeos, utilizando uma alíquota de 50 µL de cada amostra (sobrenadante) diluído, com 950 µL de MeOH, grau HPLC, e feita a análise por inserção direta no aparelho de espectrometria de massas ESI-ITMS.

Os valores de massas obtidos das análises dos sobrenadantes foram comparados com os da literatura.

#### **4.5 EXTRAÇÃO DOS LIPOPETÍDEOS**

A extração dos lipopeptídeos presentes nos sobrenadantes das linhagens produtoras foram realizadas por acidificação do sobrenadante com HCl 6M a pH 2 (LIU et al, 2012, PEYPOUX et al, 1994, RZAFINDRALAMBO et al. 1993). Após, as amostras ficaram por 10 horas de repouso a 4 °C para completar a precipitação e, em seguida, o material foi centrifugado a 4000 rpm por 20 min. Em seguida, as amostras foram colocadas em fluxo laminar e, com o auxílio de uma pipeta, o meio líquido fermentado ácido foi separado do precipitado. Os tubos contendo os precipitados de cada amostra foram transferidos para o dessecador para completar a secagem, gerando os extratos lipopeptídicos - LPX onde X representa o número de cada linhagem. O meio líquido fermentado ácido foi separado e armazenados a -6 °C para análises posteriores.

#### **4.6 SELEÇÃO DO MÉTODO PARA PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS LIPOPEPTÍDICOS**

A partir da obtenção dos extratos lipopeptídicos, foi selecionada a amostra LP76 a partir dos dados de ESI-ITMS (item 4.4) e avaliado três métodos a partir da precipitação ácida para a purificação dos lipopeptídeos: **Método 1:** Controle para fins de comparação no ESI-ITMS do extrato LP76. **Método 2:** Purificação por extração líquido-líquido com

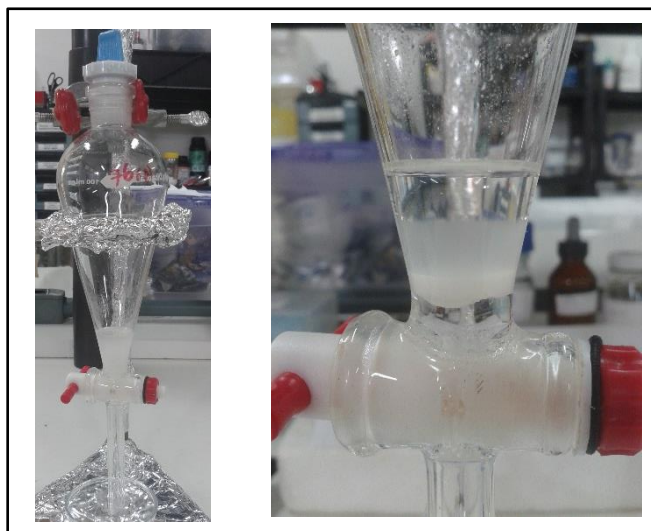
diclorometano (VATER et al., 2002). **Método 3:** Purificação por extração em fase-sólida (SPE) (RAZAFINDRALAMBO, 1993).

#### 4.6.1 Análise direta no ESI-ITMS do extrato LP76

Na análise direta por EM foi utilizado 1 mg do extrato LP76 e solubilizado em 1 mL de solução aquosa de NaOH 1 M a pH 8. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, retiraram-se 10  $\mu$ L da amostra e adicionou-se em um frasco contendo 1 mL de MeOH, grau HPLC, atingindo 10 ppm.

#### 4.6.2 Purificação por extração líquido-líquido

Na extração líquido-líquido foram utilizados 5 mg do extrato LP76 solubilizados em uma solução aquosa de NaOH 1 M a pH 8. Seguiu-se a partição utilizando 2 mL de diclorometano e água (pH 8) na proporção (1:1), agitando por 5 min e deixado por 2 h para completar a separação das fases (fase orgânica e aquosa). Este procedimento foi realizado por 3 vezes em duplicatas (Figura 8).



**Figura 8.** Extração líquido-líquido do extrato LP76.

Foram separadas as frações orgânica e aquosa e deixadas em dessecador para a evaporação dos solventes.

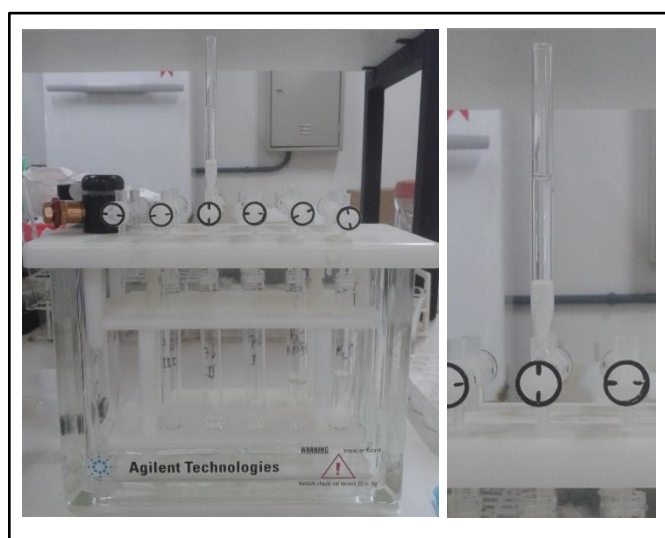
### 2.6.6 Purificação por extração em fase sólida (SPE)

A extração em SPE foi realizada a partir de 5 mg do extrato da amostra LP76. O preparo da amostra foi realizado com 1 mL de uma solução aquosa de NaOH a pH 8 e filtrada em filtros de membrana Millipore 0,45  $\mu$  (Figura 9).



**Figura 9.** Filtragem do extrato LP76 em NaOH aquoso em filtros de membrana Millipore 0,45  $\mu$ .

Para a extração em SPE foi utilizada uma mini coluna de vidro contendo 10 mg de sílica gel C18. Para o condicionamento da mesma foi utilizado 1 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O na proporção de 1:1. Em seguida, foi adicionado a amostra filtrada (LP76), seguido da adição de 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada para lavar eventuais resíduos de sais. A coluna foi devidamente secada. Em seguida, foi realizada a extração com 1 mL de MeOH por três vezes (Figura 10).



**Figura 10.** Extração em SPE do extrato LP 76.

## 4.7 AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO DOS LIPOPEPTÍDEOS POR PRECIPITAÇÃO ÁCIDA

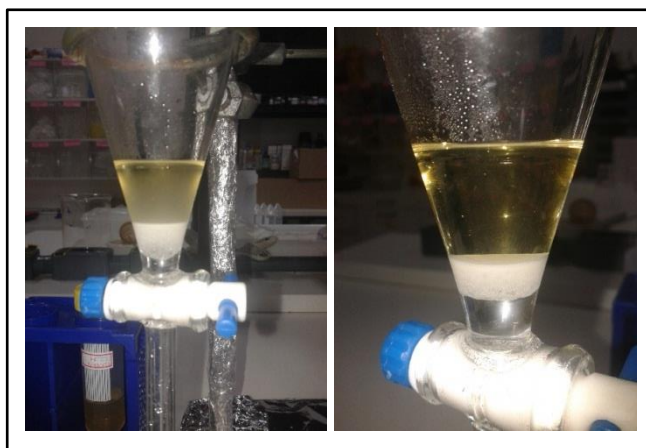
A fim de avaliar o método de extração dos lipopeptídeos, a partir da acidificação com HCl foram realizadas as análises a partir do meio líquido fermentado ácido descritas a seguir:

### 4.7.1 Análise direta no ESI-ITMS do meio ácido

Em um tubo Eppendorf de 2 mL foi adicionado 1 mL da amostra do meio líquido fermentado ácido da linhagem 76 e elevado o pH a 8 com solução de NaOH 1 M. Uma alíquota de 50  $\mu$ L desta amostra foi transferida para um frasco contendo 950  $\mu$ L de MeOH e analisada por ESI-ITMS.

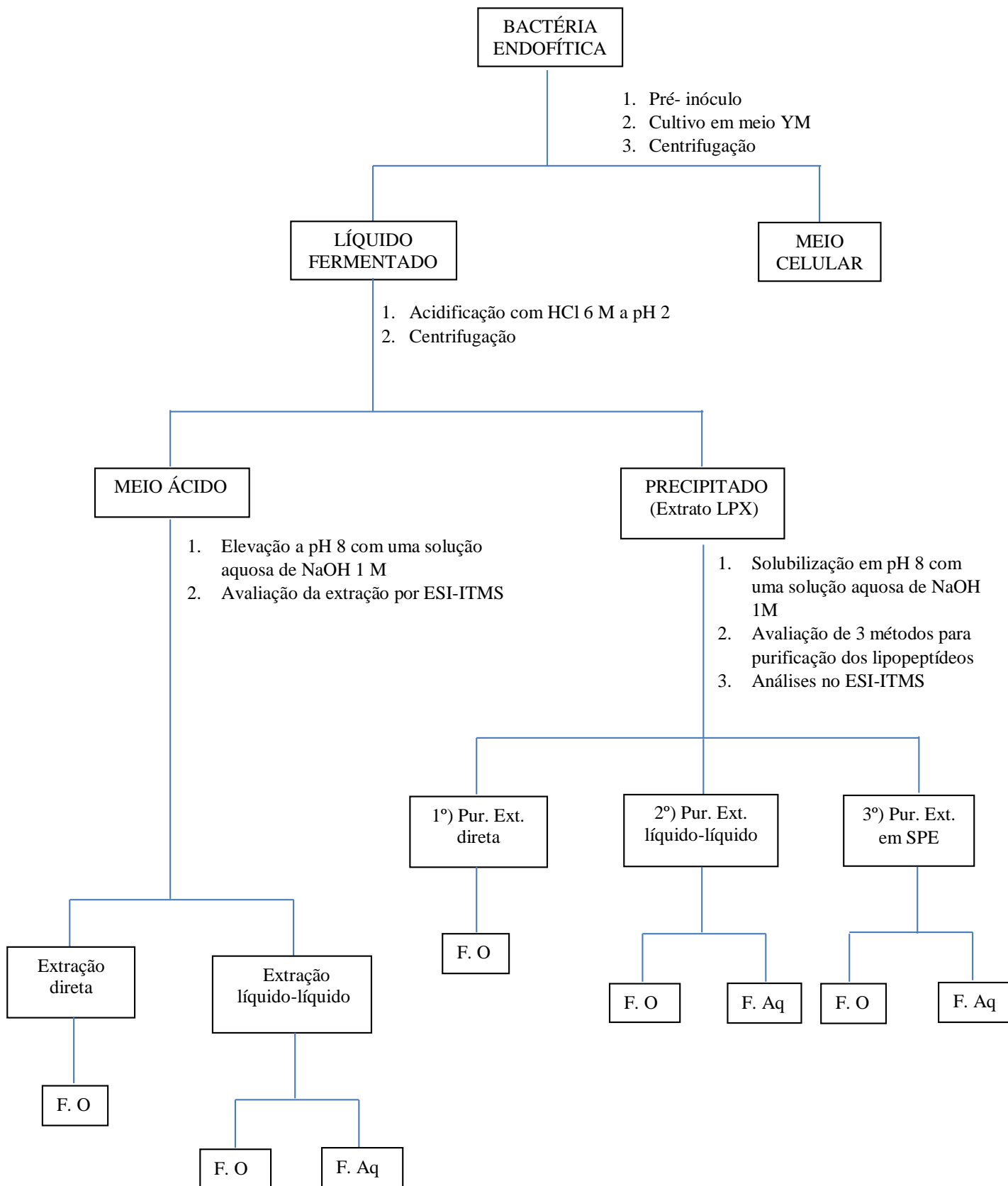
### 4.7.2 Extração líquido-líquido – Meio ácido

Uma alíquota de 3 mL do meio líquido ácido da amostra LP76 foi elevado a pH 8 com uma solução de NaOH 1M. Em seguida, foi realizada a extração líquido-líquido utilizando 2 mL de diclorometano e água (pH 8) na proporção (1:1), agitando-se por 5 min e deixando-se em repouso por 2 h para completar a separação das fases (orgânica e aquosa). Este procedimento foi realizado por 3 vezes em duplicatas (Figura 11).



**Figura 11.** Extração líquido-líquido do meio ácido da amostra LP76.

Foram separadas as frações orgânica e aquosa e deixadas em dessecador para evaporação dos solventes.



**Esquema 3.** Metodologia de extração e purificação dos lipopeptídeos.  
F.O = fase orgânica; F. Aq = fase aquosa.

## **4.8 ANÁLISES DOS EXTRATOS LIPOPEPTÍDEOS EM EQUIPAMENTO DE BAIXA RESOLUÇÃO**

As análises por espectrometria de massas dos extratos lipopeptídicos foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). As análises foram realizadas (idem 4.3.2) no aparelho de espectrometria de massas marca *Thermo Fisher*, modelo *ion trap (LCQ Fleet)* equipado com fonte de ionização por *eletrospray (ESI)* de baixa resolução no modo positivo.

As amostras foram preparadas com uma solução de NaOH 1 M a pH 8 a partir de 1 mg/mL. Para as análises do ESI-ITMS foram pipetadas alíquotas de 10 µL de cada amostra para 1 mL de MeOH, grau HPLC atingindo 10 ppm.

## **4.9 ANÁLISES DOS EXTRATOS LIPOPEPTÍDEOS EM EQUIPAMENTO DE ALTA RESOLUÇÃO**

As análises de ESI-MS de alta resolução foram realizadas (idem 4.3.3) no laboratório de espectrometria de massa Thomson da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

As amostras foram preparadas em uma solução de metanol/H<sub>2</sub>O 1:1, a partir de 1 mg/mL na concentração de 5 ppm.

## **4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA**

### **4.10.1 Microrganismos teste**

Para os ensaios de avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica foram utilizados como microrganismos testes representantes de bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* – CBAM 0282, *Staphylococcus aureus* – CBAM 324), Gram-negativas (*Escherichia coli* – CBAM 023, *Pseudomonas aeruginosa* – CBAM 222) e

levedura (*Candida albicans*- CFAM – 1342). Estes foram cedidos da coleção de microbiologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ–AM) para o laboratório de Genética Aplicada à Saúde e à Biotecnologia da Universidade do Estado do Amazonas – ESA/UEA, parceiro do Grupo de Espectrometria de Massas e Microrganismos da Amazônia - GEMMA.

#### **4.10.2 Reativação dos microrganismos teste**

Para a realização dos testes biológicos, os patógenos (item 4.10.1) foram reativados em placas de Petri pelo método de esgotamento por estrias cruzadas, nos meios de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) e MH (*Müller Hinton*) para as bactérias e Sabouraud para a levedura por 18 a 24 h a 36 °C em incubadora tipo BOD (demanda biológica de oxigênio). As bactérias endofíticas e a de solo foram reativadas pelo mesmo método utilizando o meio de cultura ISP2 (item 4.2) por 24 a 48 h a 26 °C.

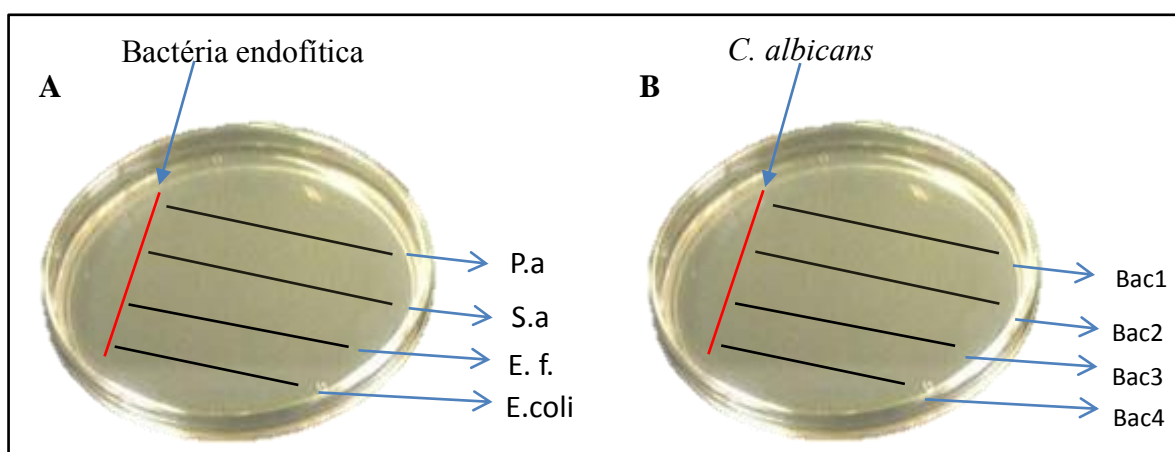
Para o teste de difusão em ágar, após o crescimento dos patógenos, foram então transferidos com o auxílio da alça de platina uma pequena quantidade de material celular para tubos de ensaio contendo os meios de cultura (MH e Sabourad) líquido correspondente com um volume de 10 mL. O crescimento dos microrganismos em meio líquido foi observado de acordo com o tubo de número 1 ( $3 \times 10^8$  mL) da escala de McFarland.

#### **4.10.3 Bioensaio em culturas pareadas – teste de Christensen**

A avaliação da atividade antibiótica das bactérias endofíticas foram realizadas na Universidade Federal do Amazonas, no laboratório do GEMMA. O método utilizado foi pelo ensaio de culturas pareadas, descrito por Christensen (1991) (método este que avalia a antibiose, o microparasitismo e competição entre os microrganismos testadores). Para



os ensaios contra as bactérias patogênicas (descritas no item 4.10.1) foi utilizado o meio de cultura BHI em placas de Petri de 90 x 15 mm. Inicialmente, com o auxílio da alça de platina, adicionou-se na placa de Petri (Esquema 4-A) uma pequena quantidade de material celular na vertical (linha vermelha) da linhagem de bactéria endofítica e em seguida foram sendo adicionadas na horizontal (linha preta) as bactérias patogênicas. Para os ensaios contra *C. albicans* foi utilizado o meio de cultura Sabourand em placas de Petri de 90 x 15 mm. Inicialmente com o auxílio da alça de platina adicionou-se na placa de Petri (Esquema 4-B) uma pequena quantidade de material celular na vertical (linha vermelha) do patógeno *C. albicans* e em seguida foram sendo adicionadas na horizontal (linha preta) as bactérias endofíticas.



**Esquema 4.** Metodologia descrita para o bioensaio de culturas pareadas pelo método de Christensen (1991). **(A)** Teste contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. **(B)** Teste contra *C. albicans*.

#### 4.10.4 Bioensaio pelo teste de difusão em ágar

A avaliação da atividade antibiótica dos extratos obtidos das 50 linhagens de bactérias endofíticas foi realizada utilizando a metodologia de difusão em ágar de acordo com Souza et al, 2003. Todas as análises foram realizadas na Universidade Federal do Amazonas, no laboratório GEMMA. Os microrganismos teste utilizados foram os descritos no item 4.8.1.

#### 4.10.4.1 Preparo das amostras e dos controles

Foram pesados 2 mg de cada extrato em microtubos do tipo Eppendorf e diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido) até a concentração de 2 mg/mL.

Os controles positivos utilizados foram específicos para cada patógeno, na concentração de 2 mg/mL:

- a) *C. albicans* – Nistatina;
- b) *S. aureus* e *E. faecalis* – Ampicilina;
- c) *E. coli* – Ciprofoxacina;
- d) *P. aeruginosa* – Tetraciclina;

Para os controles negativos foram utilizados DMSO/H<sub>2</sub>O (75%)

#### 4.10.4.2 Teste de difusão em ágar

Foram utilizados 220 µL de cada microrganismo teste, cultivados em meio líquido, e semeados com auxílio de uma alça de *Drigalski* em placa de Petri de 140 x 15 mm, contendo os meios específicos para cada patógeno (item 4.10.1). Foram confeccionados poços de 6 mm de diâmetro nos meios de cultura onde foi adicionado 100 µL de cada amostra contendo os metabólitos extracelulares das bactérias endofíticas. No controle positivo foram adicionados 100 µL da solução do antibiótico correspondente e para o controle negativo 100 µL da solução de DMSO. As leituras dos halos ou zonas de inibição foram realizadas com paquímetro (em milímetros) nos períodos de 24 e 48 horas sendo demarcado o diâmetro total da zona de inibição mais o diâmetro do poço. Os testes foram realizados em triplicatas.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5.1 SELEÇÃO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE LIPOPEPTÍDEOS POR ESI-ITMS

A análise dos sobrenadantes de cada linhagem bacteriana por espectrometria de massas utilizando a fonte ESI tornou possível a identificação das massas moleculares dos compostos lipopeptídicos.

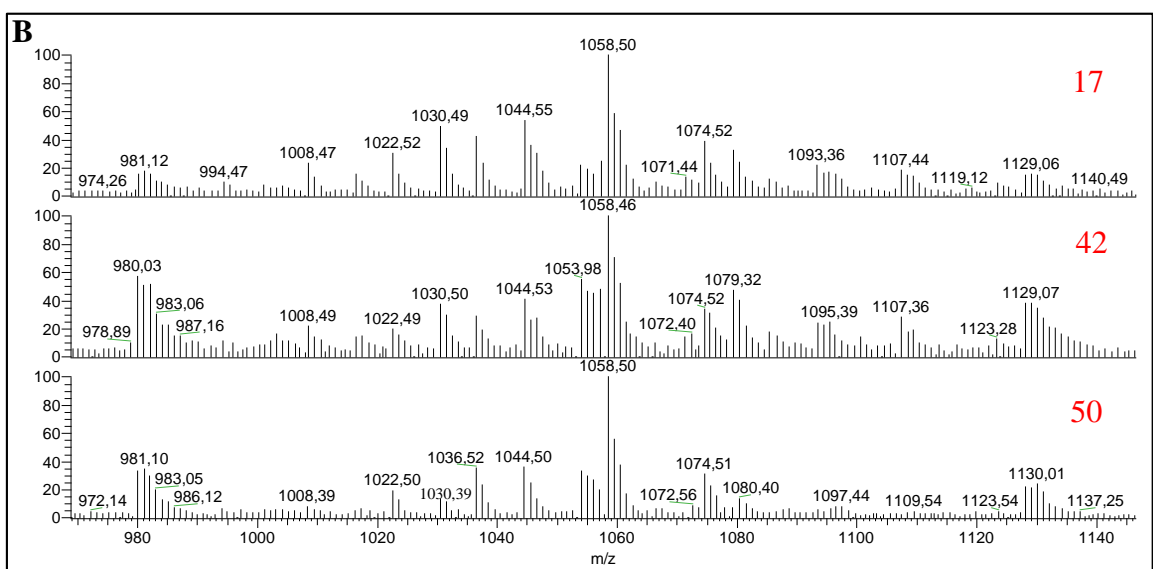
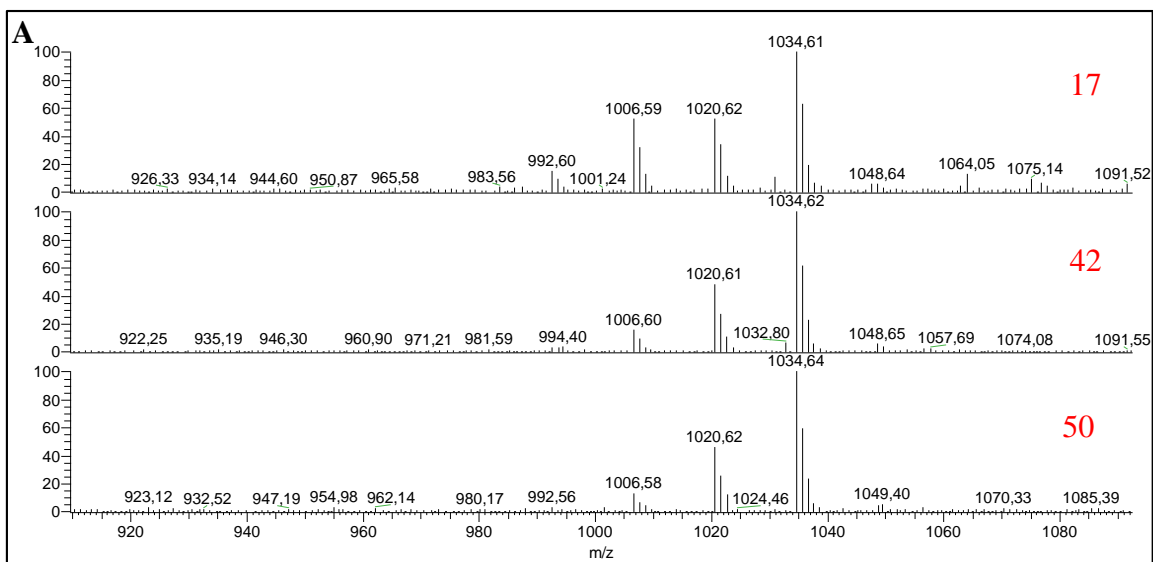
Durante a ionização por “electrospray” três tipos de ionização podem ser gerados: íons moleculares, moléculas protonadas ( $[M+H]^+$ ) /desprotonadas ( $[M-H]^-$ ) (íons *quasi*-moleculares) e moléculas cationizadas ( $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ , ou anionizadas  $[M+Cl]^-$  etc).

Os valores de  $m/z$  em modo positivo e negativo encontrados nos espectros de massas dos sobrenadantes (Figuras 12-14 e Anexos 37-42 no negativo) foram comparados com dados da literatura. Das 50 linhagens analisadas, 25 apresentaram valores de massas típicas para lipopeptídeos, sendo que as linhagens 17, 42, 50, 76, 84, 164, 196, 207 e 229 (Tabela 6) apresentaram resultados mais satisfatórios, quanto ao número de íons para essas substâncias.

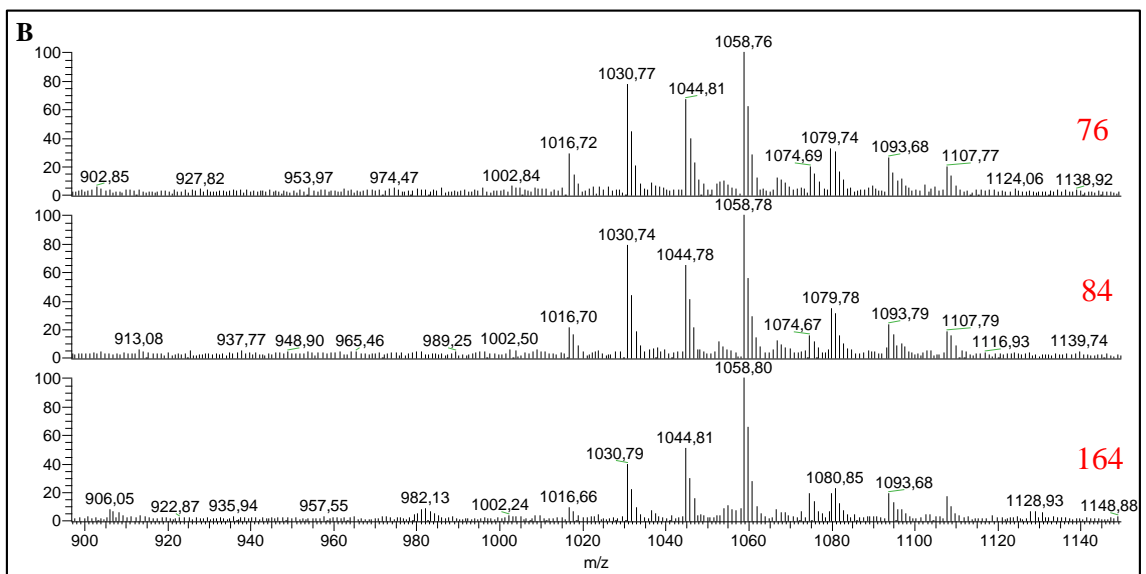
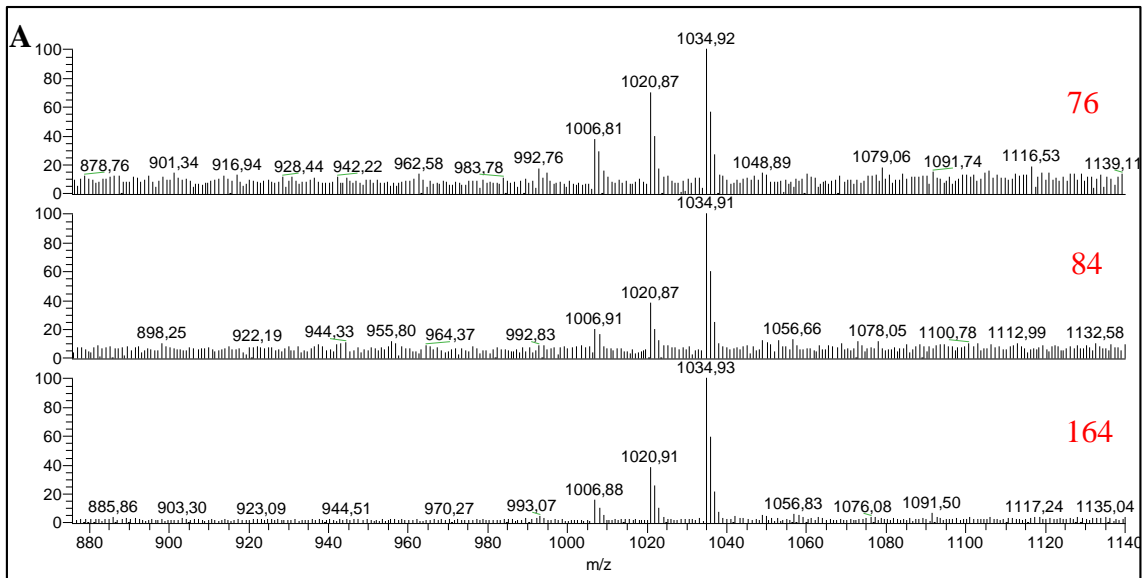
Nos espectros de massas, tanto no modo negativo quanto no positivo, é possível observar para as linhagens bacterianas 17, 42, 50, 76, 84, 164, 196, 207 e 229 valores de íons coincidentes, em  $m/z$  992, 1006, 1020 e 1034, 1048 ( $[M-H]^-$ ), e em  $m/z$  994, 1008, 1022 ( $[M+H]^+$ ), 1016, 1030, 1044, 1058 e 1072 ( $[M+Na]^+$ ) (Figuras 12-14). De acordo com dados da literatura, esses íons são coerentes com os lipopeptídeos homólogos da surfactina: C-12, C-13, C-14 e C-15 e C-16, cujas massas moleculares são respectivamente 993, 1007, 1021, 1035 e 1049, sendo o C-14 e C-15 os mais abundantes (MALFANOVA et al., 2012; MORAN et al., 2010; PECCI et al., 2010; PEYPOUX et al., 1994).

**Tabela 6.** Identificação de lipopeptídeos em amostras dos sobrenadantes das linhagens de bactérias endofíticas através da análise de ESI-ITMS no modo negativo e positivo.

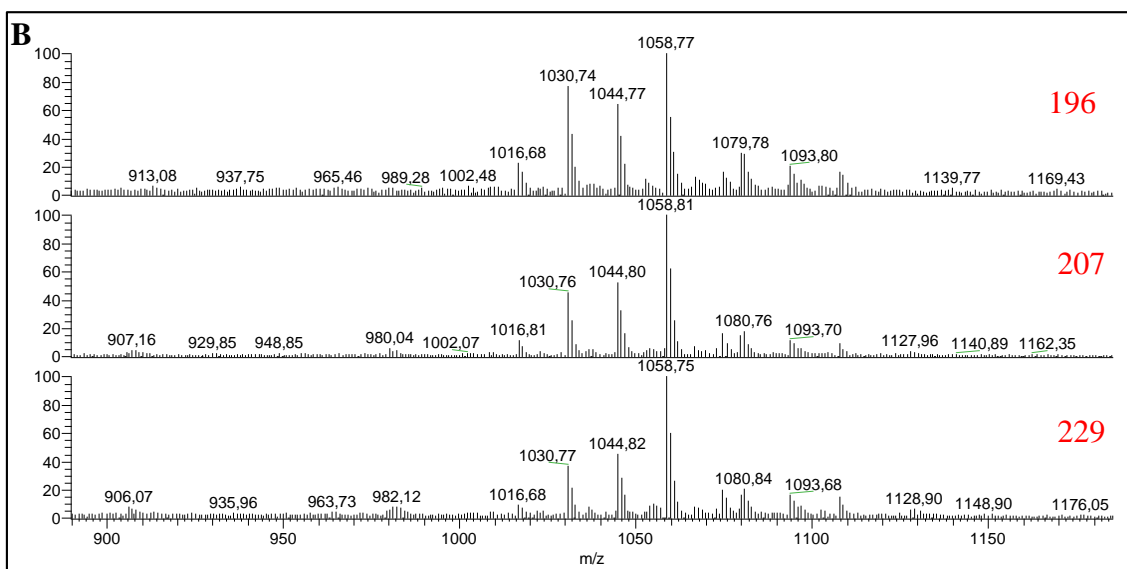
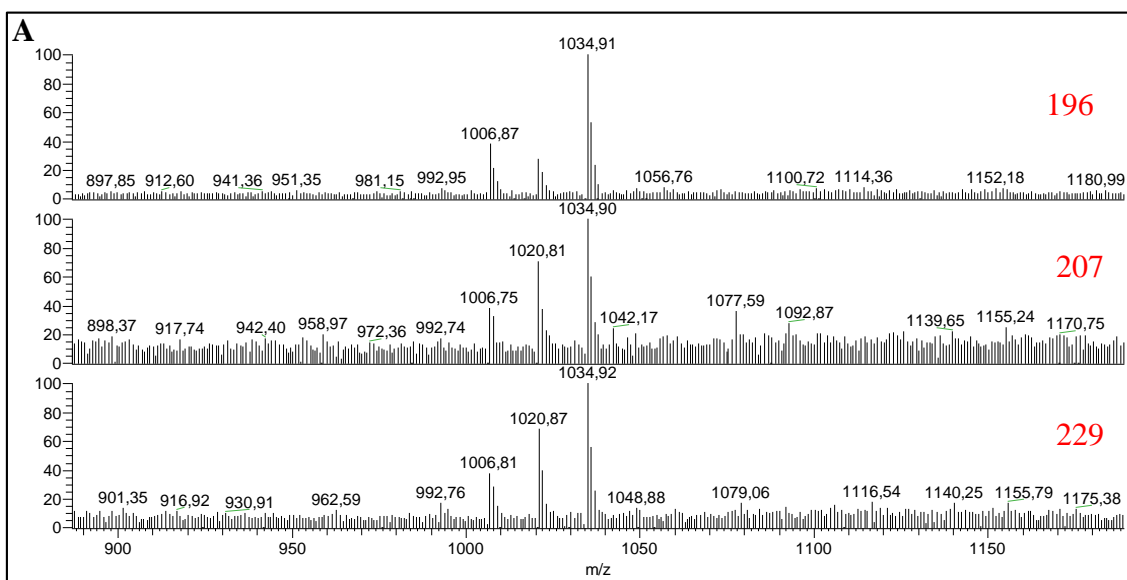
N°	Bactérias endofíticas		[M-H] <sup>-</sup>	[M+H] <sup>+</sup> ou [M+Na] <sup>+</sup>
1	17	Gh Cc3 1.2a	992, 1006, 1020, 1034, 1048	994, 1030, 1044, 1058, 1072
2	41	Gh F1 1.2 bBB	992	1030, 1058
3	42	GhCr3 1.1a	992, 1006, 1020, 1034, 1048	1022, 1036, 1044, 1058, 1072
4	47	GhCg1 2.2b	1034	1030, 1036, 1044
5	48	GhCc1 1.2d	992, 1006, 1020	1022, 1044, 1058
6	50	GhCc1 2.1a	992, 1006, 1020, 1034, 1048	994, 1016, 1030, 1044, 1058, 1072
7	56	Caule BDA + CT 1.1.1B	1034	1044
8	63	BDA = CT Flor 2.4.1	1006, 1020, 1034	1030, 1044, 1058
9	66	Flor 1.1.3b1	1020, 1034	1022, 1044, 1058
10	67	ISP2 + CT Folha 1.1.3	992, 1020, 1034	1016, 1036, 1044, 1058
11	68	MaO6 Caita 2.2.3	1006, 1119	1044
12	73	BDA Caule 1.2.1	1006, 1020, 1034	1016, 1036, 1044, 1058
13	76	Folha BDA1.3.1a	992, 1006, 1020, 1034, 1048	1016, 1030, 1036, 1044, 1058, 1072
14	81	Caule aveia 1.2.2	1006, 1020, 1034	1016, 1036, 1044, 1058
15	84	Folha BDA 1.4.1	992, 1006, 1020, 1034, 1048	994, 1016, 1030, 1036, 1044, 1058, 1072
16	109	DgCc1 2.1	1119	1016, 1044
17	164	Ppc12.2b	992, 1006, 1020, 1034	994, 1016, 1030, 1036, 1044, 1058
18	185	DgR2 1.2	1006	1030
19	189	DgFr1 2.3c	992, 1006, 1020	1044
20	191	DgFr1 2.3b	1006, 1020, 1034	1008, 1030, 1044
21	196	DgCr2 1.1b	992, 1006, 1020, 1034, 1048	994, 1022, 1030, 1044, 1058, 1058
22	207	Ansp R1 1.3	992, 1006, 1020, 1034, 1048	994, 1022, 1016, 1030, 1044, 1058, 1072
23	224	Ansp C2.2.1.c	992, 1006, 1034	1016, 1020, 1058
24	229	Dfga1. 1. 2	992, 1006, 1020, 1034, 1048	994, 1022, 1016, 1030, 1044, 1058, 1072
25	239	Cosp R2 13 la7.BAc	1034	1058



**Figura 12.** Espectros de massas ESI-ITMS: (A) Modo negativo e (B) Modo positivo para as linhagens 17 (Gh Cc3 1.2a), 42 (GhCr3 1.1a) e 50 (GhCc1 2.1).



**Figura 13.** Espectros de massas ESI-ITMS: (A) Modo negativo e (B) Modo positivo para as linhagens 76 (Folha BDA1.3.1), 84 (Folha BDA 1.4.1) e 164 (Ppc12.2b).



**Figura 14.** Espectros de massas ESI-ITMS: (A) Modo negativo e (B) Modo positivo para as linhagens 196 (DgCr2 1.1b), 207 (AnspR1 1.3) e 229 (Dfga1. 1. 2).



## 5.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS LIPOPEPTÍDEOS

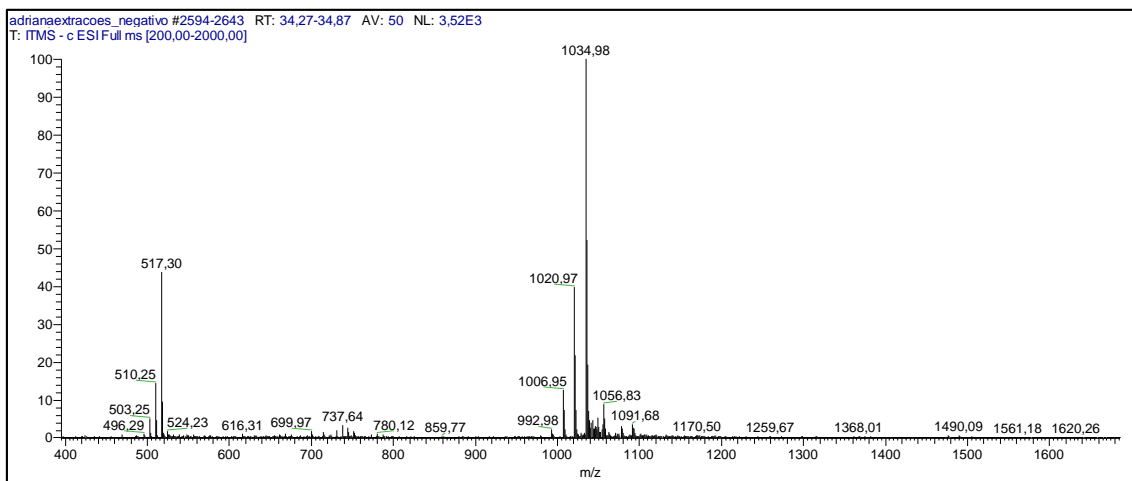
### 5.2.1 Comparação entre os métodos de purificação

De acordo com os dados de análise de ESI-ITMS no modo negativo das frações orgânicas e da fração aquosa (Método 2) obtidas pelos métodos 1, 2 e 3 foi possível detectar a presença dos íons correspondentes aos homólogos da surfactina de  $m/z$  992, 1006, 1020 e 1034. Na extração líquido-líquido (Método 2) observou-se através dos espectros de ESI-ITMS (Figura 16) que ambas as frações (fases orgânica e aquosa) apresentaram semelhanças nos íons para estes compostos. Ao comparar os dados dos espectros de ESI-ITMS dos métodos 1 (Figura 15) e 2, observou-se que, houve semelhanças no perfil químico das amostras. Os íons observados em  $m/z$  503, 510 e 517 ( $[M-2H]^{-2}$ ) são correspondentes aos íons de  $m/z$  1006, 1020 e 1034 visto que, segundo Cantú e colaboradores (2008), moléculas grandes como os lipopeptídeos adquirem múltiplas cargas no processo de ionização por eletrospray.

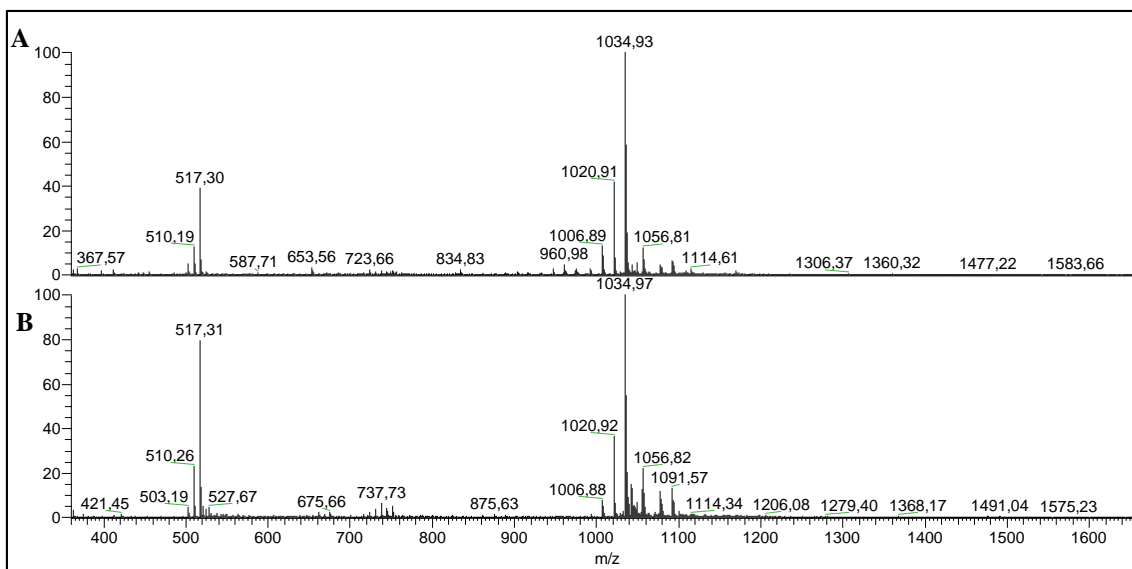
A figura 17 mostra os dados das análises da extração por SPE (Método 3). Observou-se que, na amostra da fase aquosa (solução de preparo da amostra) não foi detectado a presença significativa de íons com massas para os lipopeptídeos, indicando que estes compostos ficaram retidos na fase estacionária (sílica gel), o que já era esperado. Logo, observou-se que na amostra da fração orgânica foi possível detectar os íons homólogos dos lipopeptídeos, além do íon de  $m/z$  653, sendo, portanto, parte de resíduos presentes na fração aquosa.

Logo, após análise dos extratos obtidos pelos métodos de purificação dos lipopeptídeos por espectrometria de massas, verificou-se que os métodos 2 e 3 apresentaram resultados semelhantes ao método 1. Além de produzir um perfil químico semelhante aos demais métodos de purificação, o método 1 tornou-se mais viável, por não ser necessário o uso de materiais cromatográficos, bem como, a utilização de maiores

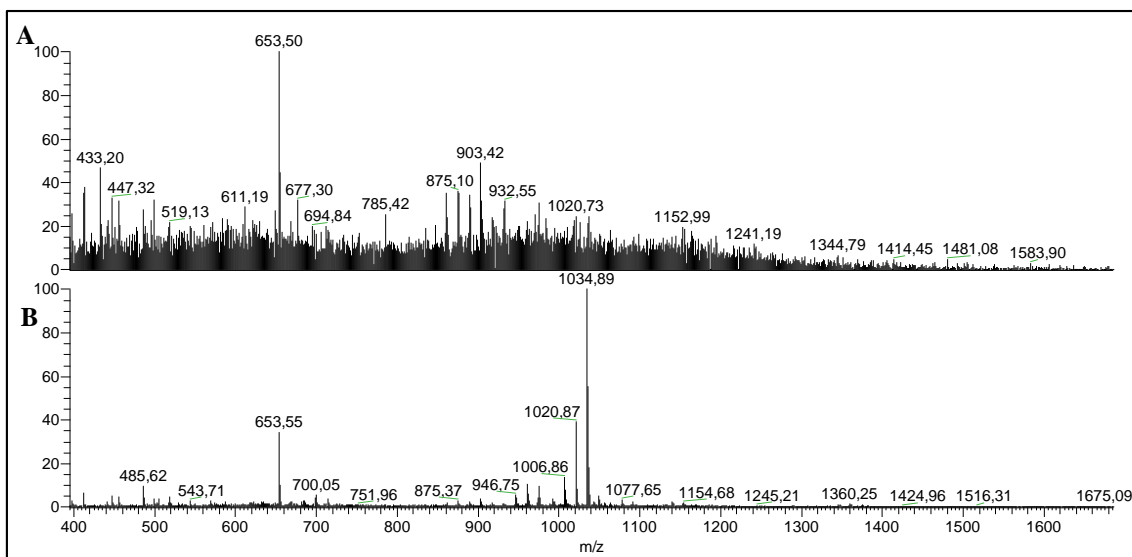
quantidades de massa das amostras e de solventes orgânicos. Com isso, foi selecionado o método 1 para a realização dos testes biológicos e para as análises por espectrometria de massas.



**Figura 15.** Espectro de ESI-ITMS da amostra do método 1 no modo negativo.



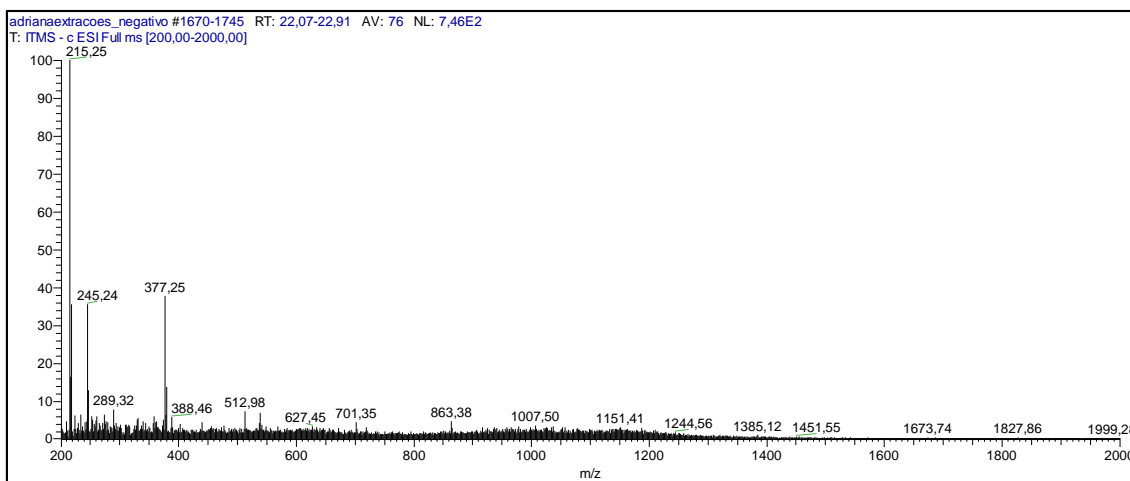
**Figura 16.** Espectro de ESI-ITMS das amostras do método 2 no modo negativo. (A) Fração da fase orgânica e (B) Fração da fase aquosa.



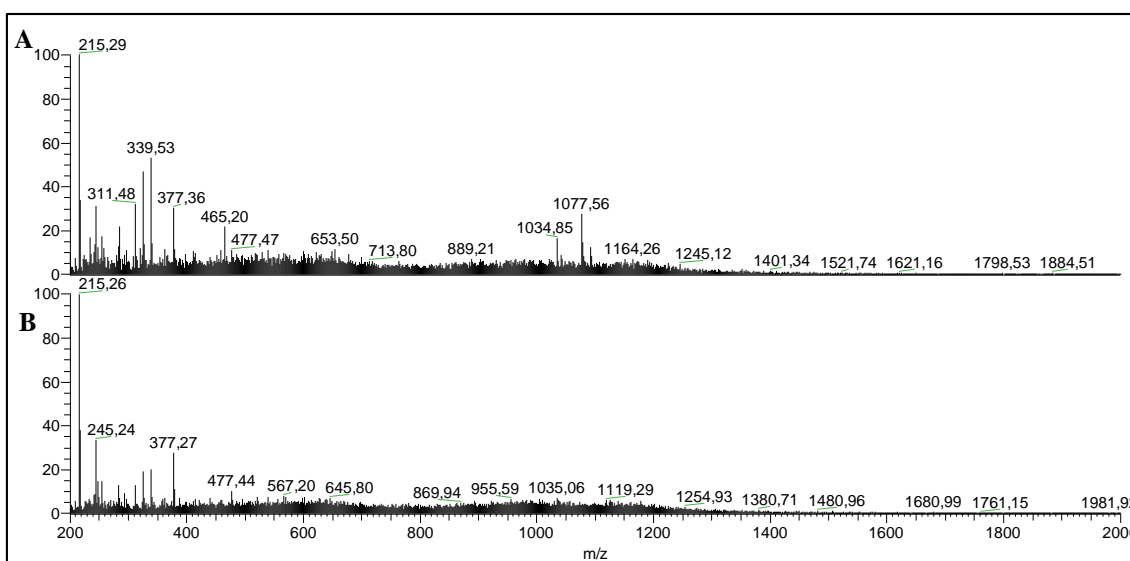
**Figura 17.** Espectro de ESI-ITMS das frações do método 3 no modo negativo: **(A)** Fração da fase aquosa da amostra e **(B)** Fração MeOH.

### 5.2.2 Avaliação da extração dos lipopeptídeos por precipitação ácida

Após análise por ESI-ITMS da fração do meio ácido da linhagem 76 por inserção direta (Figura 18), verificou-se que não houve a detecção dos íons correspondentes para os lipopeptídeos, apresentados anteriormente pela fração do extrato LP 76 (Figura 15 do item 5.2.2). Da mesma forma, verificou-se resultados semelhantes nos espectros da fração aquosa do meio ácido, obtida por extração líquido-líquido (Figura 19-B). Embora nas análises de ESI-ITMS da fração orgânica do meio ácido ter sido detectado o íon de  $m/z$  1034 (Figura 19-A), a intensidade do mesmo foi relativamente baixa quando comparada com as análises do extrato (Figura 16-B) para esta mesma linhagem. Logo, as análises de espectrometria de massas evidenciaram que o método de extração dos lipopeptídeos a partir da precipitação ácida proposta pela literatura (LIU et al, 2012, PEYPOUX et al, 1994, RZAFINDRALAMBO et al. 1993) é eficaz.



**Figura 18.** Espectro de ESI-IT-MS no modo negativo da amostra do meio ácido da linhagem 76 por análise direta.

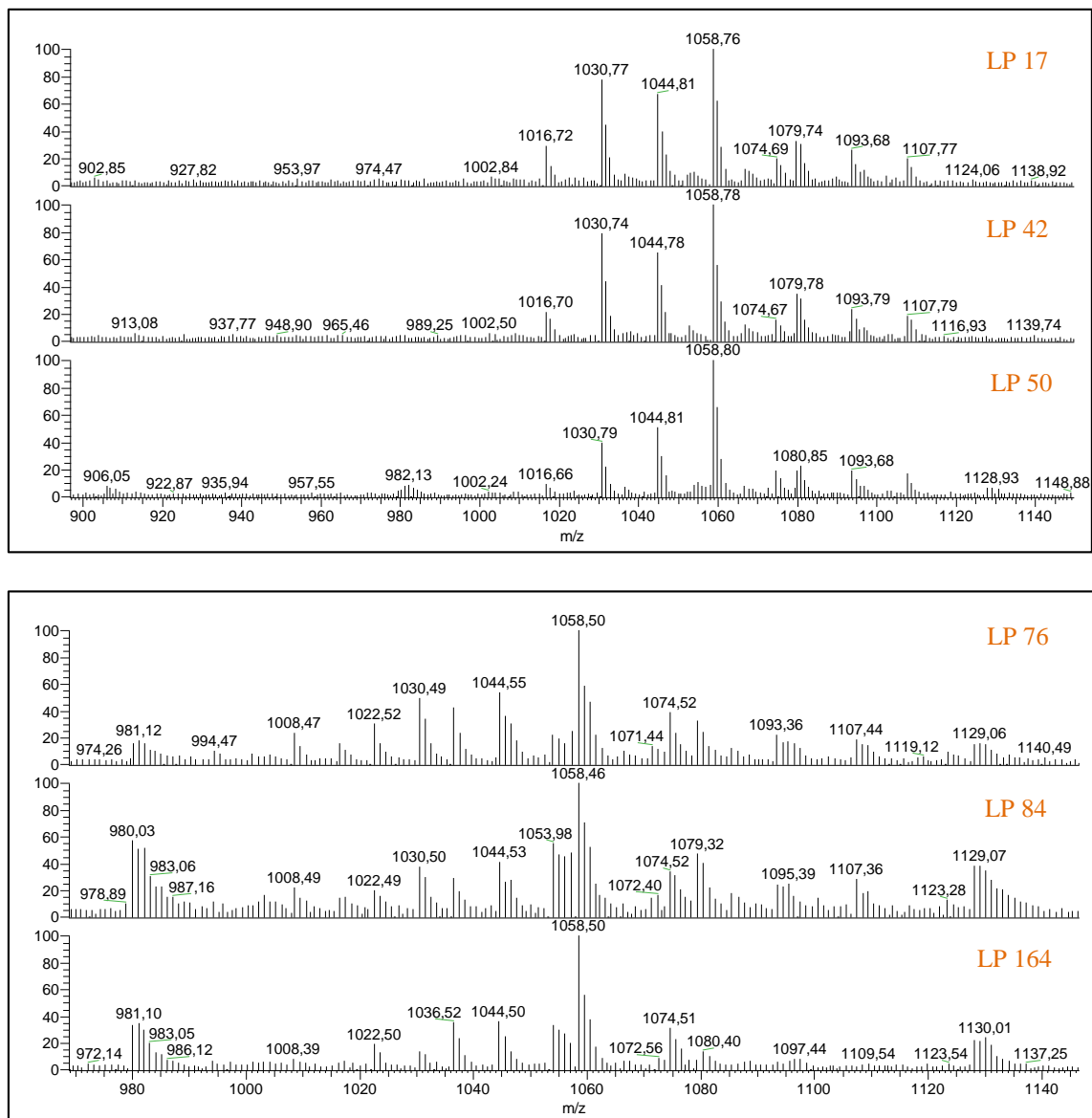


**Figura 19.** Espectros de ESI-IT-MS no modo negativo das frações do meio ácido obtidos por extração líquido- líquido. (A) Fração da fase orgânica e (B) Fração da fase aquosa.

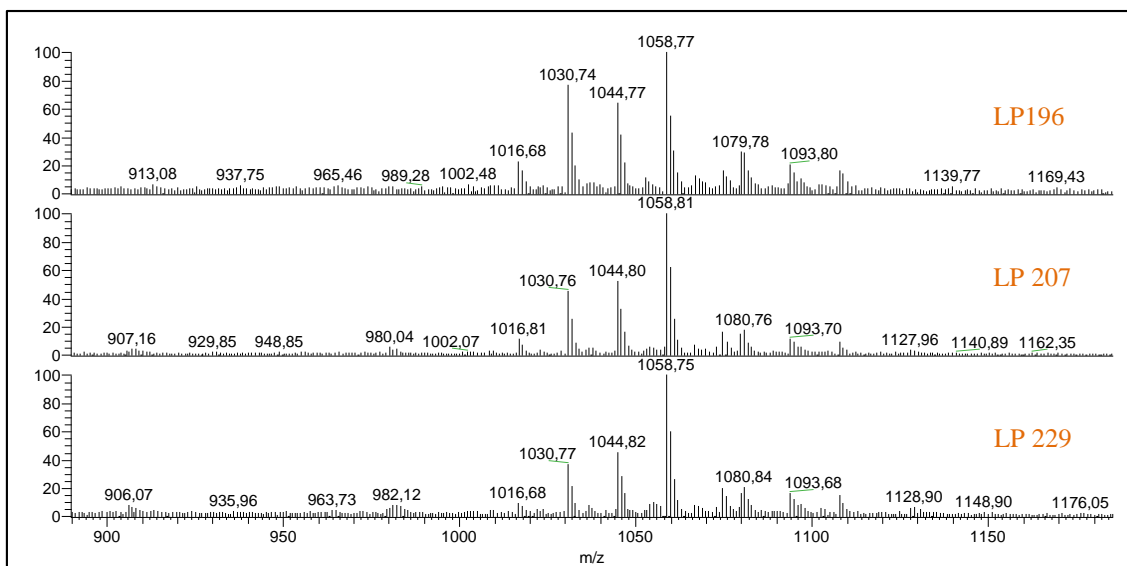
### 5.3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOPEPTÍDEOS PRESENTES NOS EXTRATOS SELECIONADOS POR ESI-ITMS DE BAIXA RESOLUÇÃO

Os extratos lipopetídicos das linhagens selecionadas (item 5.1 e tabela 6), LP17 (Gh Cc3.1.2a), LP42 (GhCr3.1.1a), LP50 (GhCc1. 2.1), LP76 (Folha BDA1.3.1), LP84 (Folha BDA 1.4.1), LP164, (Ppc1.2.2b) LP196, (DgCr2.1.1b), LP207 (AnspR1.1.3) e LP229 (Dfga1.1.2) foram submetidos a análises de ESI-ITMS no modo positivo, e detectados os

íons de  $m/z$  1016, 1030, 1044, 1058 e 1072 ( $[M+Na]^+$ ) (Figura 20), sendo os mesmos íons detectados no meio líquido dos sobrenadantes (item 5.1), característicos dos homólogos da surfactina.



**Figura 20.** Espectros de massas ESI-ITMS no modo positivo para as linhagens LP17, (Gh Cc3 1.2 a), LP42 (GhCr3 1.1a), LP50 (GhCc1 2.1), LP76 (Folha BDA1.3.1), LP84 (Folha BDA 1.4.1) e LP164 (Ppc12.2b).



**Figura 21.** Espectros de massas ESI-ITMS no modo positivo para as linhagens LP196 (DgCr2 1.1b), LP207 (AnspR1 1.3) e LP229 (Dfgal. 1. 2).

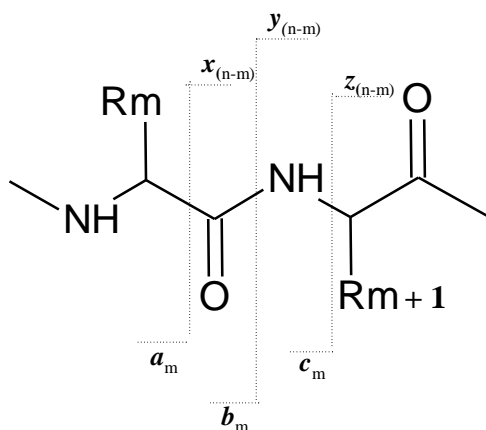
A intensidade relativa dos íons reflete a composição percentual de cada molécula nas amostras analisadas. Desta forma, os íons de  $m/z$  1030, 1044 e 1058 (Figuras 20 e 21) foram os íons predominantes nas amostras dos extratos lipopeptídicos, sendo que o mais abundante foi o  $m/z$  1058.

De acordo com Araújo e colaboradores (2010) as bactérias endofíticas podem colonizar os mais variados tecidos vegetais, sendo possível a mesma bactéria colonizar diferentes partes da planta. Sendo assim, as semelhanças nos íons detectados entre as linhagens LP17, LP42 e LP50, pode estar relacionado à mesma bactéria produtora, uma vez que, foram isoladas da mesma planta (*Gustavia hexapetala*), descrito na tabela 5. Também é observado tais semelhanças, entre as linhagens LP76 e LP84 produzidos pelas bactérias isoladas das folhas de *Macrófita aquática 01*.

Os resultados das análises de ESI-ITMS apresentados acima não elucidam especificamente detalhes estruturais e a distribuição dos aminoácidos em cada molécula é também a mesma para os homólogos da surfactina. Para tanto, foi feita a fragmentação dos íons característicos para estes compostos por ESI-ITMS<sup>2</sup>, descrita a seguir.

### 5.3.1 Caracterização dos lipopeptídeos por ESI-ITMS<sup>2</sup> de baixa resolução

A fragmentação dos lipopeptídeos por EM, para a posterior análise de sua sequência de aminoácidos, foi realizada por meio do processo de dissociação induzida por colisão (*collision induced dissociation* – CID). Neste processo, os lipopeptídeos foram inicialmente introduzidos em uma região de vácuo do espectrômetro de massas por meio do processo de *electrospray*. Os lipopeptídeos ionizados foram acelerados para uma região do espectrômetro preenchida com um gás inerte, hélio, proporcionando, assim, a colisão entre os lipopeptídeos ionizados e as moléculas do gás inerte. Como resultados, a energia translacional transferida em cada colisão foi convertida em energia interna, culminando na desestabilização das ligações do esqueleto polipeptídico e, por consequência, induzindo a formação de dois íon-fragmentos (MANN et al., 1989), que são classificados como íon que retém a carga residual no lado N-terminal (gerando fragmentos *a*, *b*, e *c*, dependendo da ligação que é fragmentada) e íons que retém a carga residual na região C-terminal (gerando os fragmentos *x*, *y* e *z*, dependendo da ligação que é fragmentada) (Esquema 5), segundo a nomenclatura proposta por Roepstorff–Fohlmann–Biemann (1984). É importante enfatizar que os pares de íons *a/x*, *b/y* e *c/z* serão sempre íons correspondentes aos fragmentos opostos e complementares entre si. Considerando-se que as ligações peptídicas são aquelas menos energéticas, espera-se que a formação do par de fragmentos *b/y* seja mais frequente que os demais pares de fragmentos, facilitando a interpretação dos espectros (CANTÚ et al., 2008).



**n**: número total de resíduos no peptídeo  
**m**: número de resíduos correspondentes aos íons *a*, *b* ou *c*.

**Esquema 5.** Representação esquemática da estrutura química geral de um peptídeo apresentando a nomenclatura proposta por Roepstorff-Fohlmann-Biemann dos fragmentos formados devido à transferência de energia para o peptídeo.

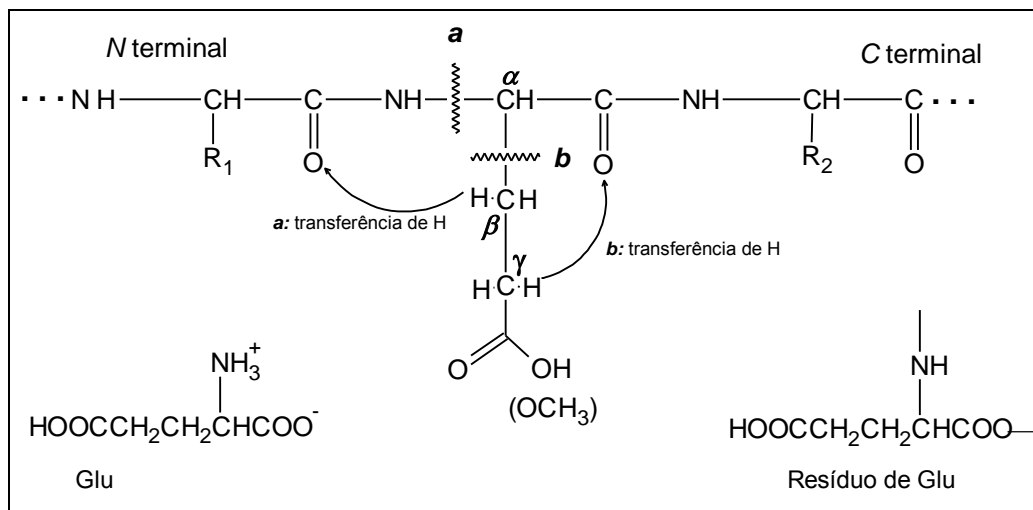
A fragmentação de peptídeos cíclicos como os lipopeptídeos não ocorre de forma usual. Nos compostos cíclicos da família da surfactina, por exemplo, existe uma ligação de lactona na qual o aminoácido C-terminal está ligado através de uma ligação éster ao ácido graxo  $\beta$ -hidróxi. A ligação éster é muito mais fraca do que a de uma amida, logo é razoável que a abertura do anel ocorra na ligação lactônica, ou seja, na ligação do éster. Com isso, duas séries de íons, C-terminal e N-terminal podem ser formadas, e o íon sódio se ligará ao oxigênio alcoxi entre os resíduos C-terminal e a cadeia alifática.

Yang e colaboradores (2008) propõem dois mecanismos de fragmentação para a clivagem do anel destes compostos. Sendo o primeiro, por heterólise da ligação éster, denominado de clivagem simples, gerando os íons da série N-terminal. E o segundo, pelo mecanismo de transferência dupla de hidrogênio (DHT) pelo rearranjo de McLafferty, gerando os íons C-terminal.

De acordo com o conceito de rearranjo de McLafferty, teoricamente, alguns resíduos de aminoácidos em uma cadeia peptídica podem sofrer rearranjo, através de duas maneiras. Uma delas é que o hidrogênio no carbono  $\beta$  de um resíduo de aminoácido é transferido ao oxigênio da carbonila do resíduo de aminoácido N-terminal adjacente,



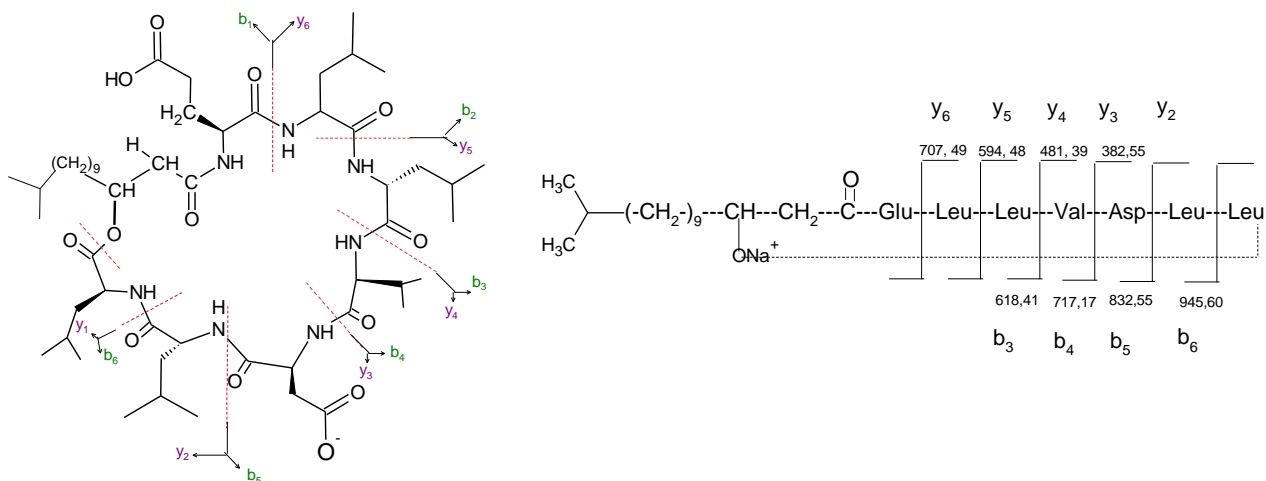
ocorrendo a clivagem da ligação peptídica C( $\alpha$ )-N que é chamada rearranjo interresíduo de McLafferty, tal como ilustrado no esquema 6a. A outra é a de que o hidrogênio do carbono  $\gamma$  é transferido do resíduo de um aminoácido ao oxigênio da sua carbonila, ocorrendo a clivagem na ligação C ( $\alpha$ )-C ( $\beta$ ) do resíduo amino, chamada rearranjo de McLafferty intra-resíduo como ilustrado no Esquema 6b.



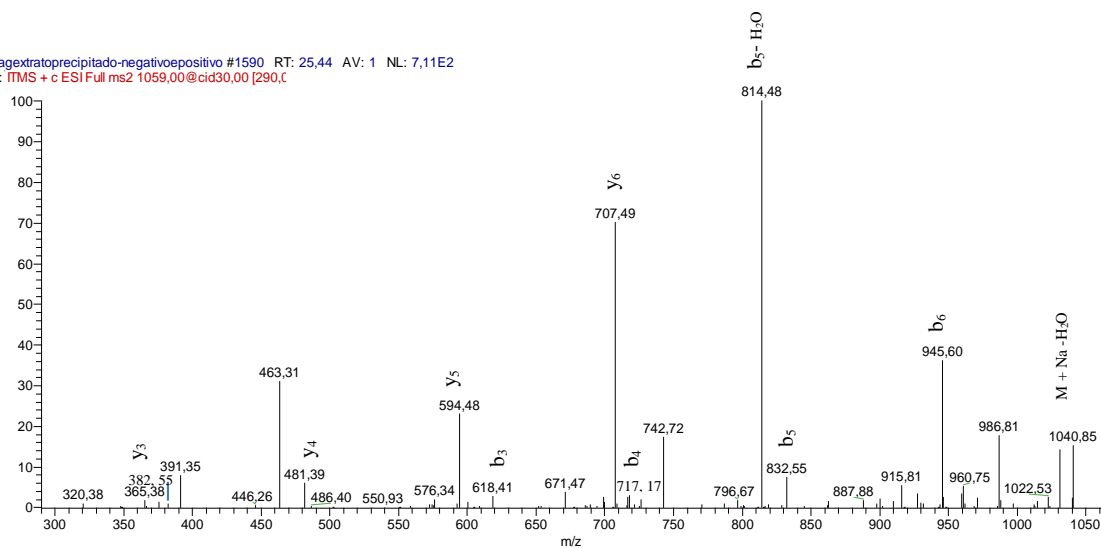
**Esquema 6.** Ilustração do rearranjo de McLafferty de um resíduo amino em uma cadeia peptídica onde: (a) O local e a direção da clivagem da transferência do  $\gamma$ -H pelo Rearranjo interresíduo de McLafferty e (b) O local e a direção da clivagem  $\gamma$ -H pelo Rearranjo intraresíduo de McLafferty. (Fonte: Yang et. al, 2008).

De acordo com as análises de ESI-ITMS para os extratos lipopeptídicos, as amostras analisadas apresentaram íons semelhantes entre si para lipopeptídeos, logo as fragmentações de ESI-ITMS<sup>2</sup> foram realizadas a partir da amostra LP84 (Folha *Mácrofita* aquática 01). Cada homólogo obtido foi fragmentado, porém, somente será apresentado o espectro obtido para o homólogo mais abundante de  $m/z$  1058. Os espectros dos demais homólogos encontram-se nos Apêndices (Figura 44), em exceção ao íon de  $m/z$  1016 por ser relativamente o íon menos abundante, não foi possível obter íons fragmentos utilizando ESI-MS<sup>2</sup> de baixa resolução.

As análises de fragmentação forneceram as estruturas dos homólogos descritos na tabela 7. O íon precursor mais abundante de  $m/z$  1058 resultou nos seguintes íons:  $m/z$  1040, 945, 832, 814, 717, 618, 707, 594, 481, e 382 (Figura 22).



fragextratoprecipitado-negativo #1590 RT: 25.44 AV: 1 NL: 7,11E2  
 F: ITMS + c ESI Full ms2 1059,00@cid30,00 [290,C



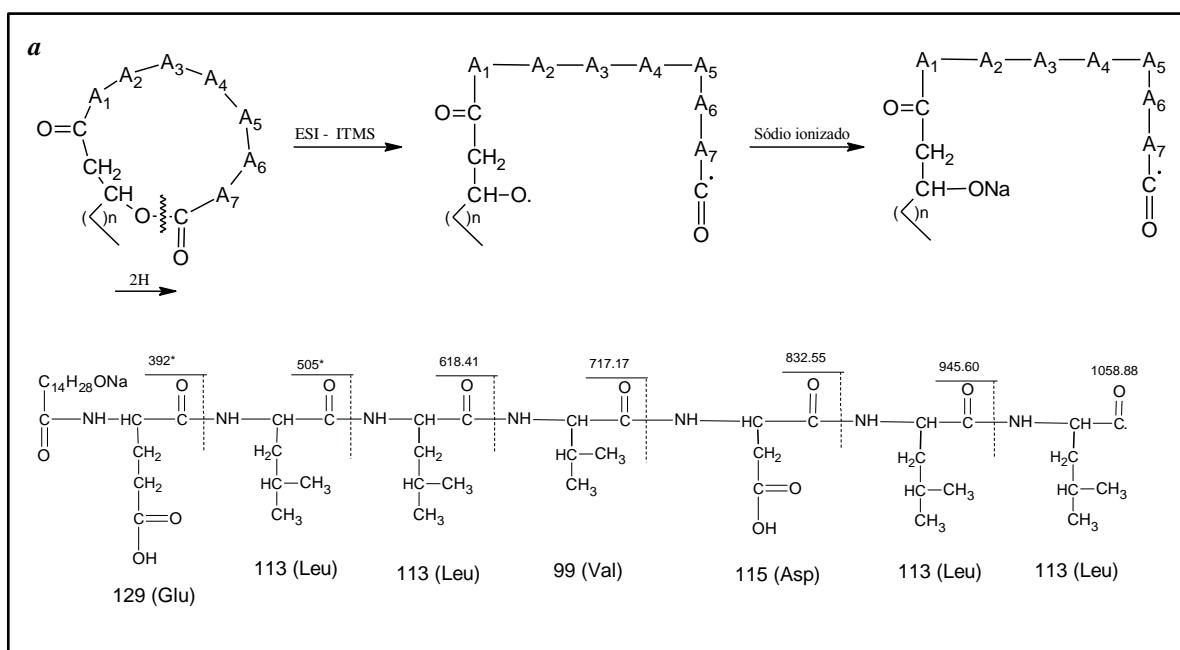
**Figura 22. (A)** Estrutura do lipopeptídeo C15 da surfactina apresentando as regiões de fragmentações e a nomenclatura *y* e *b* proposta por Roepstorff–Fohlmann–Biemann. **(B)**. Espectro de ESI no modo positivo do íon sodiatado de *m/z* 1058.

O íon de *m/z* 1040 corresponde à perda de água (-18 Da) a partir do íon de *m/z* 1058.

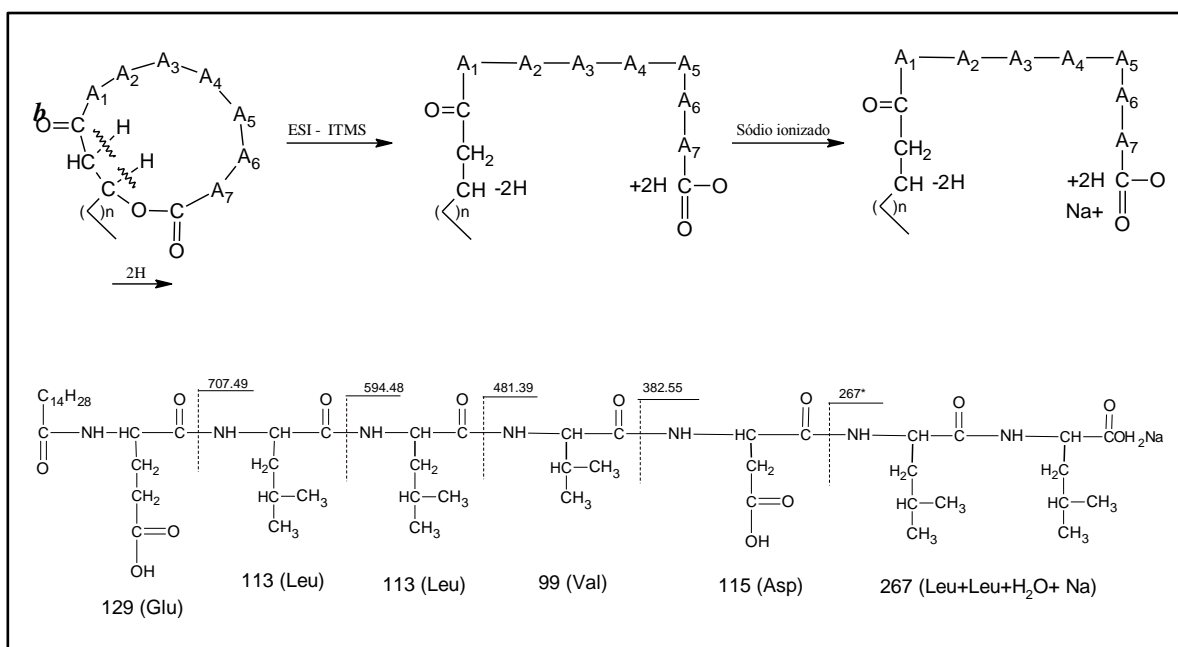
Os valores dos íons restantes foram identificados em duas séries a partir da abertura do anel lactona do íon de *m/z* 1058. A primeira série (alifática) contém os íons N-terminal de *m/z* 945 (*b*<sub>6</sub>), 832 (*b*<sub>5</sub>), 814, 717 (*b*<sub>4</sub>) e 618 (*b*<sub>3</sub>) derivados da clivagem simples (Figuras 21 e 22-a) que correspondem, respectivamente, às perdas de Leu (-113 Da), Leu-

Leu (-226 Da), Leu-Leu-H<sub>2</sub>O (-244), Asp-Leu-Leu (-341 Da) e Leu-Leu-Asp-Val (-440 Da).

A segunda série (peptídica) contém os íons C-terminal de  $m/z$  707, 594, 481, 463 e 382 formados por clivagem dos peptídeos pelo mecanismo de DHT como sugerido pela literatura (LIU et al., 2008; YANG, et al., 2006). Este mecanismo conduziu a formação dos íons fragmentos da série peptídica (Figura 22-*b*), onde os fragmentos C-terminal são gerados pela perda da cadeia lateral  $\beta$ -hidróxi (x). Logo, os íons de  $m/z$  707, 594, 481 e 382 correspondem respectivamente à perda de x-Glu (-351 Da), de x-Glu-Leu (-464 Da), de x-Glu-Leu-Leu (-577 Da), e de x-Glu-Leu-Leu-Val (-676 Da).



**Figura 23.** Fragmentação do íon de  $m/z$  1058 por: (a) Clivagem simples. Fonte: Adaptado de LIU et al., (2008).



**Figura 24.** Fragmentação do íon de  $m/z$  1058 por: **(b)** Clivagem com transferência dupla de hidrogênio. Fonte: Adaptado de LIU et al., (2008).

**Tabela 7.** Íons detectados por fragmentação (ESI-ITMS<sup>2</sup>) dos homólogos da surfactina a partir dos íons percusores de  $m/z$  1030, 1044, 1058 e 1072.

Produtos da 1 <sup>a</sup> série (alifática)	Fragmentações	[M + Na] <sup>+</sup> ( $m/z$ )			
		1030 C <sub>13</sub>	1044 C <sub>14</sub>	1058 C <sub>15</sub>	1072 C <sub>16</sub>
[M + Na - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>		1012	1026	1040	1054
[M + Na - Leu] <sup>+</sup>	b <sub>6</sub>	917	931	945	959
[M + Na - Leu-Leu] <sup>+</sup>	b <sub>5</sub>	804	818	832	846
[M + Na - Leu-Leu-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	b <sub>4</sub>	786	800	814	828
[M + Na - Leu-Leu-Asp-Val] <sup>+</sup>	b <sub>3</sub>	590	604	618	632
<b>Produtos da 2<sup>a</sup> série (peptídica)</b>					
[M + Na - x-Glu] <sup>+</sup>	y <sub>6</sub>	707	707	707	707
[M + Na - x-Glu-Leu] <sup>+</sup>	y <sub>5</sub>	594	594	594	594
[M + Na - x-Glu-Leu-Leu] <sup>+</sup>	y <sub>4</sub>	481	481	481	481
[M + Na - x-Glu-Leu-Leu-Val] <sup>+</sup>	y <sub>3</sub>	382	382	382	382

x = cadeia lateral

De acordo com a proposta de fragmentação sugerida (Figuras 23 e 24), foi permitido estabelecer a sequência dos aminoácidos, sendo, N-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu-C,

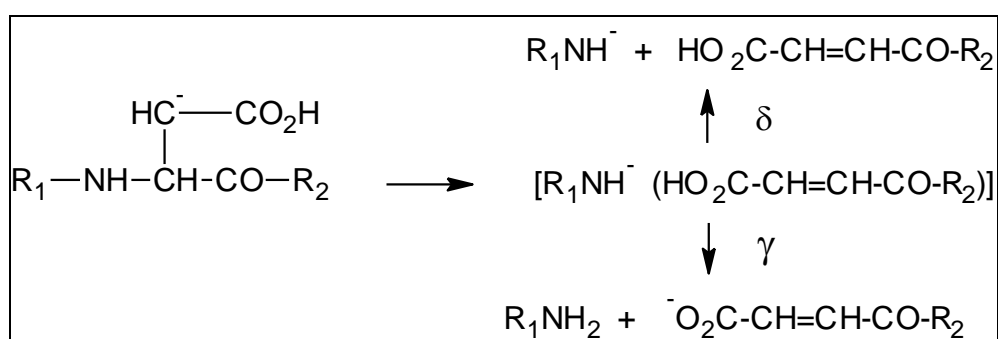
apresentando diferenças apenas nos íons referente aos fragmentos da série N-terminal. Por exemplo, para o homólogo  $m/z$  1030, os íons b3, b4, b5 e b6 (Tabela 7) se diferenciam em 14 Da, referente ao grupo metilênico (-CH<sub>2</sub>-) dos íons correspondentes do homólogo  $m/z$  1044, e assim por diante. Com esses dados, pode-se atribuir que a cadeia de ácido graxo varia de 13 a 16 átomos de carbono.

As isorformas A, B da surfactina variam apenas na posição 7 do aminoácido da cadeia peptídica, sendo respectivamente, Leu e Val. Estas diferenças podem variar dependendo da linhagem e dos meios de cultivos utilizados (BONMATIN et al., 2003). A diferença de 18 Da entre os íons fragmentos de  $m/z$  832 (Leu-Leu) e 814 (Leu-Leu-H<sub>2</sub>O) (Figura 23) indica que o aminoácido C-terminal é a Leucina.

### **5.3.2 Caracterização dos lipopeptídeos por ESI-MS<sup>2</sup> de alta resolução**

Segundo Harisson & Young (2006) o uso de estudos de dissociação induzida por colisão (CID) em espectrometria de massa para identificar e para proporcionar a sequência de aminoácidos presentes em peptídeo linear está bem estabelecida. No entanto, a maioria das análises de ESI-MS<sup>n</sup> de peptídeos tem sido realizada no modo positivo, enquanto que por desprotonação são menos comuns e, como resultado menos é conhecido sobre os modos detalhados da fragmentação de espécies desprotonadas (BOWIE et al., 2002; HARISSON et al., 2006; MEN & WANG, 2006). Isto se deve, porque os resíduos amino terminal dos aminoácidos básicos, ou seja, arginina, lisina, histidina, são peptídeos que facilitam a formação de íons protonados. Porém alguns peptídeos, no entanto, são ricos em resíduos ácidos tais como o ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), aminoácidos fosforilados, ácido sulfínico cisteína [C(SO<sub>2</sub>H)], e ácido sulfônico cisteína [C(SO<sub>3</sub>H)], sendo estes dois últimos, produtos de oxidação de cisteína (MEN & WANG, 2006). A presença destes resíduos ácidos na molécula, irá

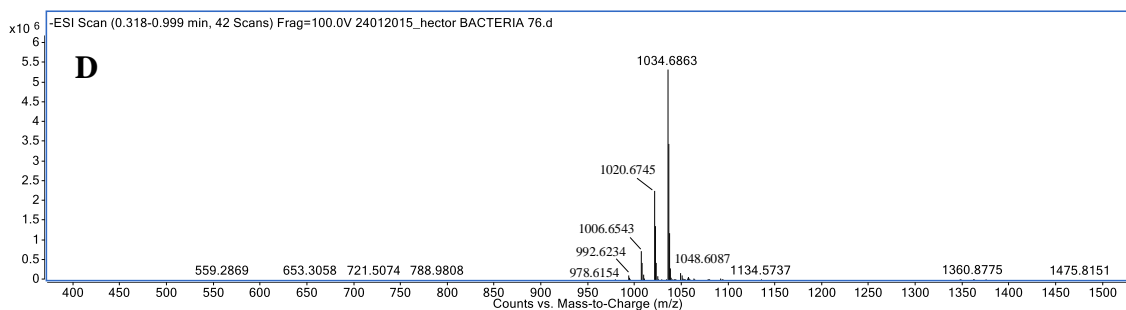
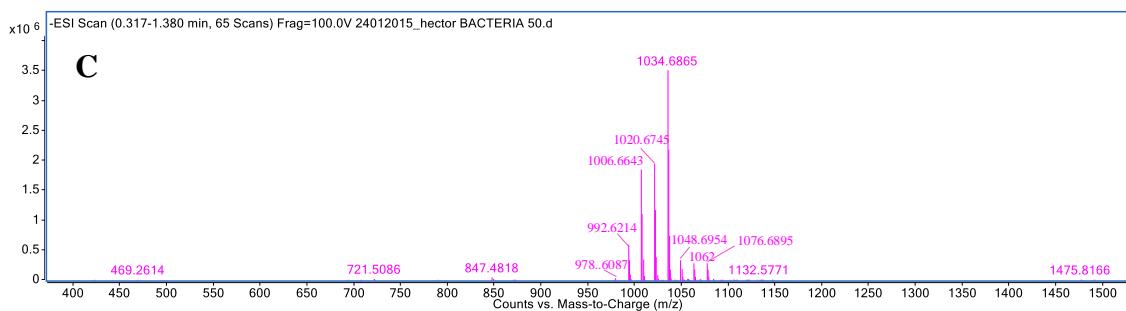
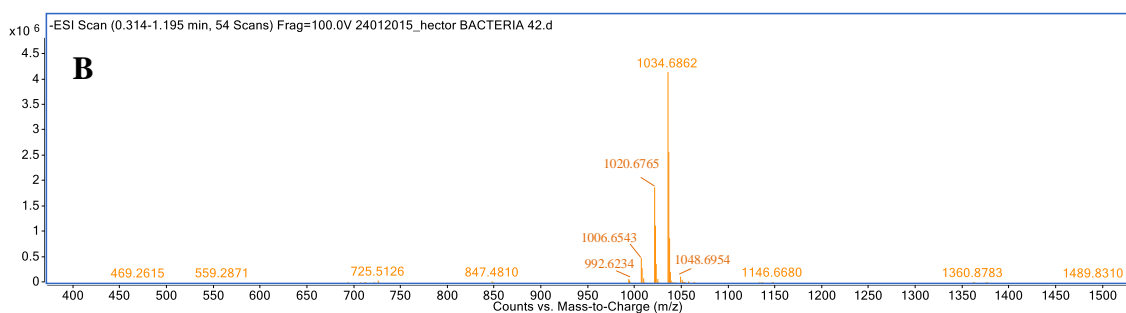
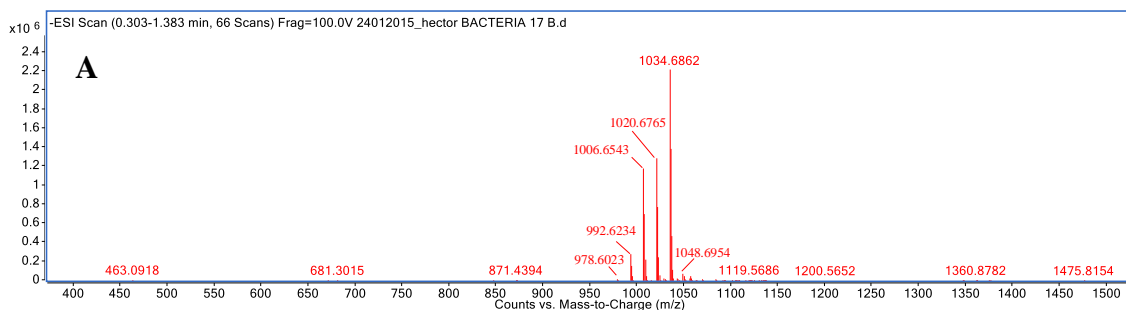
facilitar a desprotonação dos peptídeos durante a ionização, oferecendo um meio alternativo para suas análises em ESI-MS no modo negativo. A este respeito, Bowie e colaboradores (2002) realizaram amplas investigações sobre as fragmentações de desprotonação dos íons de peptídeos, mostrando que, espectros contendo os íons produtos no modo negativo podem, por vezes, oferecer informações não disponíveis a partir de seus correspondentes íons no modo positivo. Além disso, a sequência das clivagens das ligações por fragmentação de desprotonação podem ocorrer por vários ácidos aminados pelas clivagens  $\gamma$  e  $\delta$  e resultar na formação de íons  $c$  e  $z$  (Esquema 7), além da formação dos fragmentos  $a/x$ ,  $b/y$  seguindo a nomenclatura introduzida por Roepstorff et al. (1984), assim como no modo positivo (Esquema 5). No entanto, o mecanismo de formação dos íons no modo negativo são bem diferentes dos seus íons complementares no modo positivo. Apesar de mais complexas, as fragmentações no modo negativo foram realizadas, pois os experimentos no modo positivo já haviam sido realizados e se buscavam informações complementares, das surfactinas presentes nas amostras, além do fato de que elas possuem dois resíduos ácidos, Glu e Asp, que facilitaríamos a ionização por perda de próton.

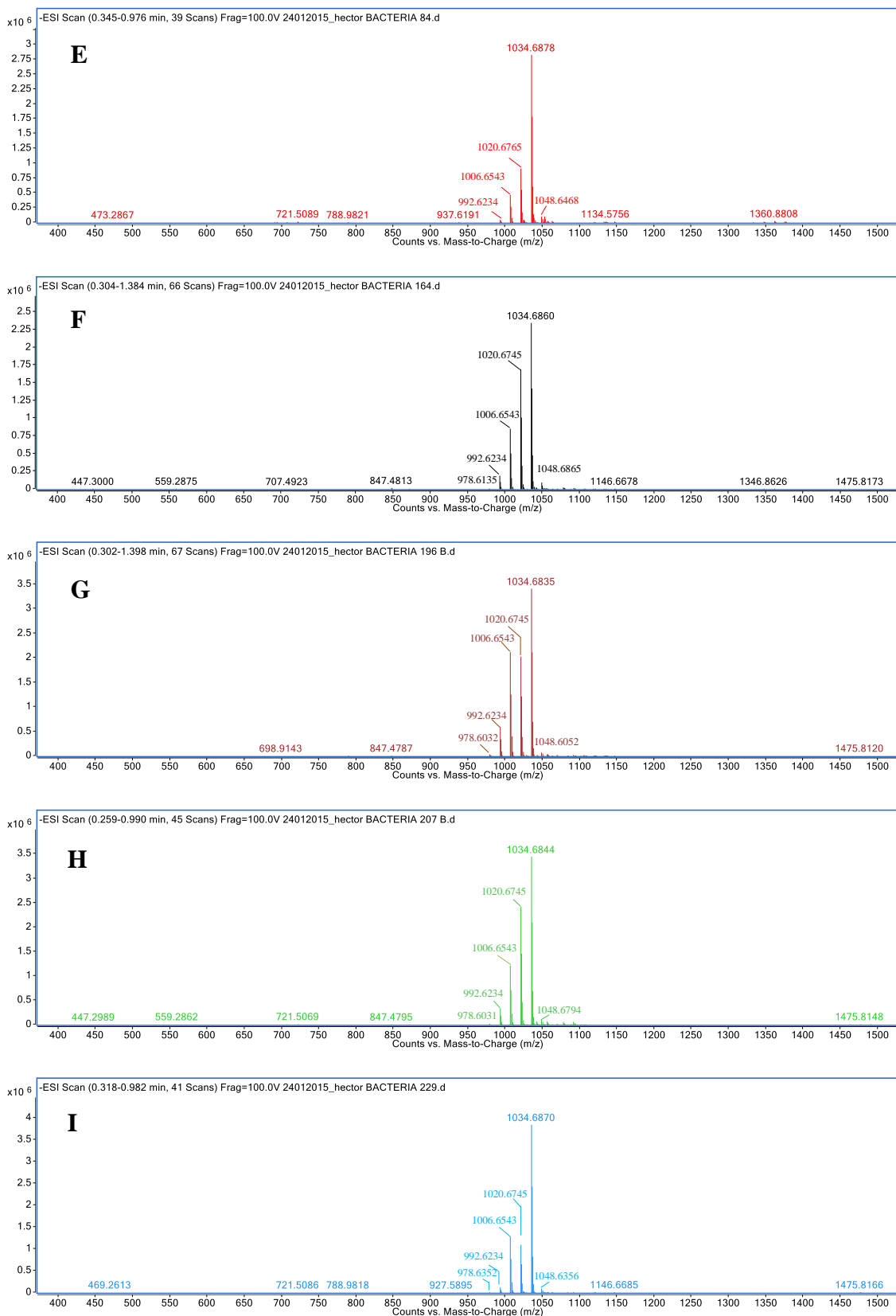


**Esquema 7.** Representação da clivagem  $\gamma$  e  $\delta$  a partir do resíduo do ácido aspártico. Fonte: Bowie et. al, 2002.

Os íons principais formados pela desprotonação foram de  $m/z$  978, 992, 1006, 1020, 1034, 1048, 1062 e 1076 (Figura 25). Todas as amostras analisadas apresentaram

semelhanças nos íons percussores, no entanto o íon de  $m/z$  978 foi detectado apenas nas amostras LP 17, 50, 76, 164, 196, 207 e 229, e os íons 1062 e 1076, na amostra LP 50. Por isso as análises de ESI-MS<sup>2</sup> foi realizada na amostra LP 50.

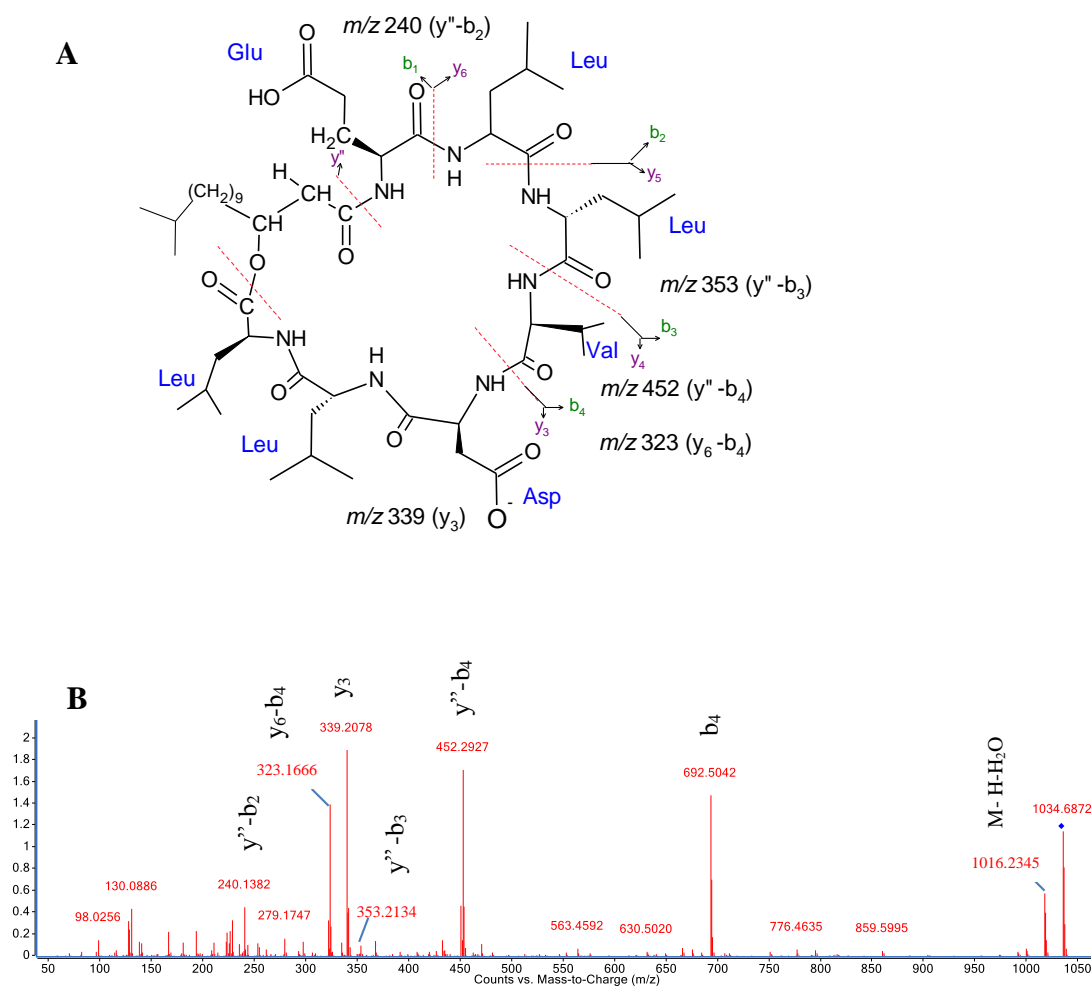




**Figura 25.** Espectros de ESI-MS<sup>2</sup> no modo negativo dos extratos LP: (A) 17 (B) 42 (C) 50 (D) 76 (E) 84 (F) 164 (G) 196 (H) 207 e (I) 229.



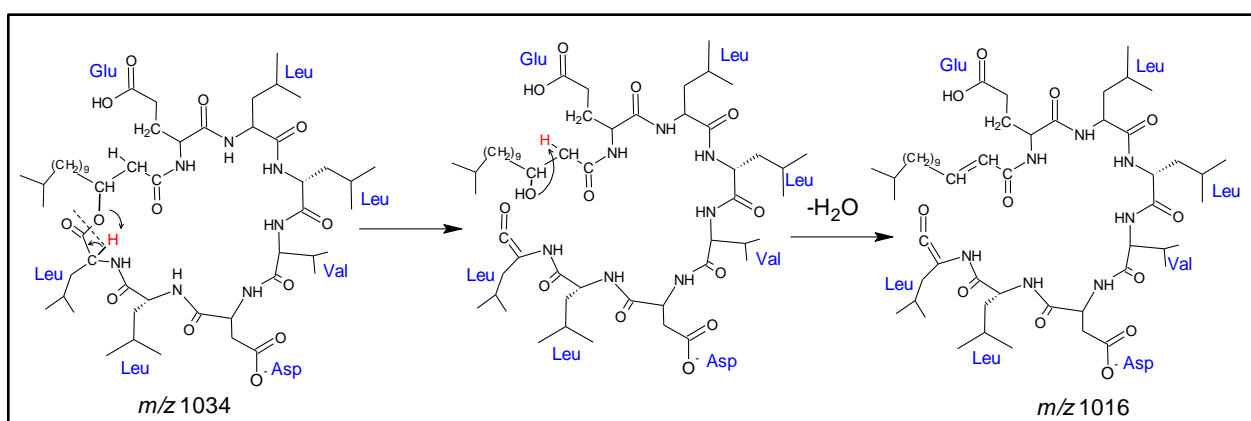
Os íons de  $m/z$  992, 1006, 1020 e 1034 (Figura 25) foram os íons predominantes nas amostras dos extratos LP sendo que o mais abundante foi o  $m/z$  1034, coerente com os resultados da análise no modo positivo que indica a surfactina C-15 como a mais abundante nas amostras. As análises de fragmentação dos íons dos homólogos forneceram as estruturas descritas na tabela 8. O íon precursor mais abundante de  $m/z$  1034 resultou nos íons de  $m/z$  1016, 692, 452, 353, 339, 323 e 240 (Figura 26).



**Figura 26.** (A) Estrutura da surfactina C15 apresentando as regiões e a nomenclatura  $y$  e  $b$  das fragmentações por ESI-MS<sup>2</sup>. (B). Espectro de massa no modo negativo do íon de  $m/z$  1034. ( $y''$ ) corresponde à clivagem na ligação do carbono  $\alpha$  da carbonila da cadeia lateral com o N-terminal do ácido Glu.

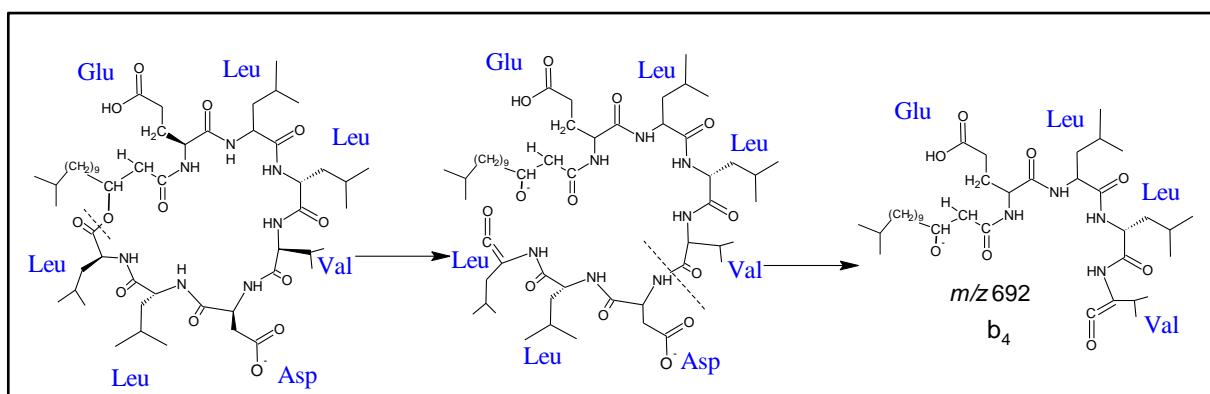
Em estudos realizados por Men & Wang, (2009) e Andrezza e colaboradores (2009) sugerem que o processo inicial de fragmentação ocorra a partir da abertura do anel

lactônico. Inicialmente, ocorre a desprotonação, ou seja, a perda de hidrogênio  $[M-H]^-$  do grupo carboxila da cadeia lateral da Asp. Em seguida, ocorre a transferência do átomo de hidrogênio do carbono  $\alpha$  da Leu (em vermelho), para o oxigênio do grupo éster por meio da migração 1,3 de hidrogênio. Em seguida, a ligação carbono (da Leu) - oxigênio (do grupo éster) é quebrada, abrindo o ciclo sequencialmente (Figura 27). A clivagem ocorre na ligação lactona, formando um ceteno e um álcool (MEN & WANG, 2009; ANDREAZZA, et al., 2009). Finalmente, o composto, que perde água  $[M-H-H_2O]$  após abertura do anel, forma o íon  $m/z$  1016 (Figura 27).



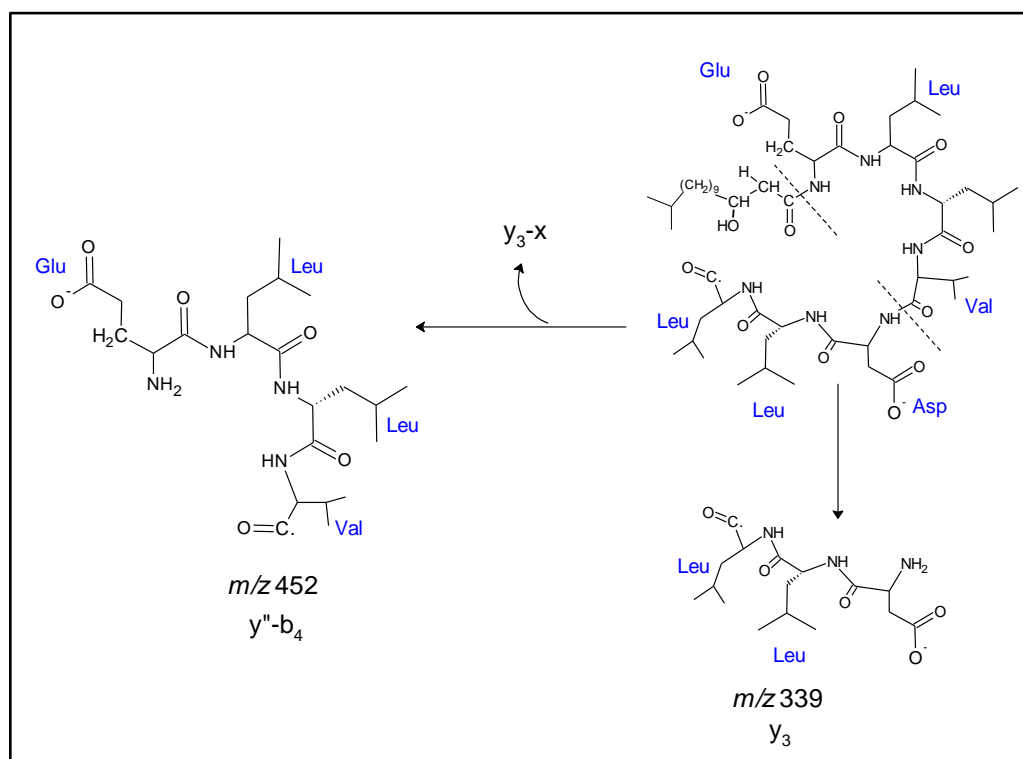
**Figura 27:** Proposta de fragmentação para o íon de  $m/z$  1016.

Os valores dos íons restantes foram identificados em duas séries a partir da abertura do anel lactona do íon de  $m/z$  1034. A primeira corresponde à série alifática que contém o íon N-terminal de  $m/z$  692 ( $b_4$ ) que corresponde a perda de Leu-Leu-Asp- (-342 Da) (MORAN et al., 2010) (Figura 28).



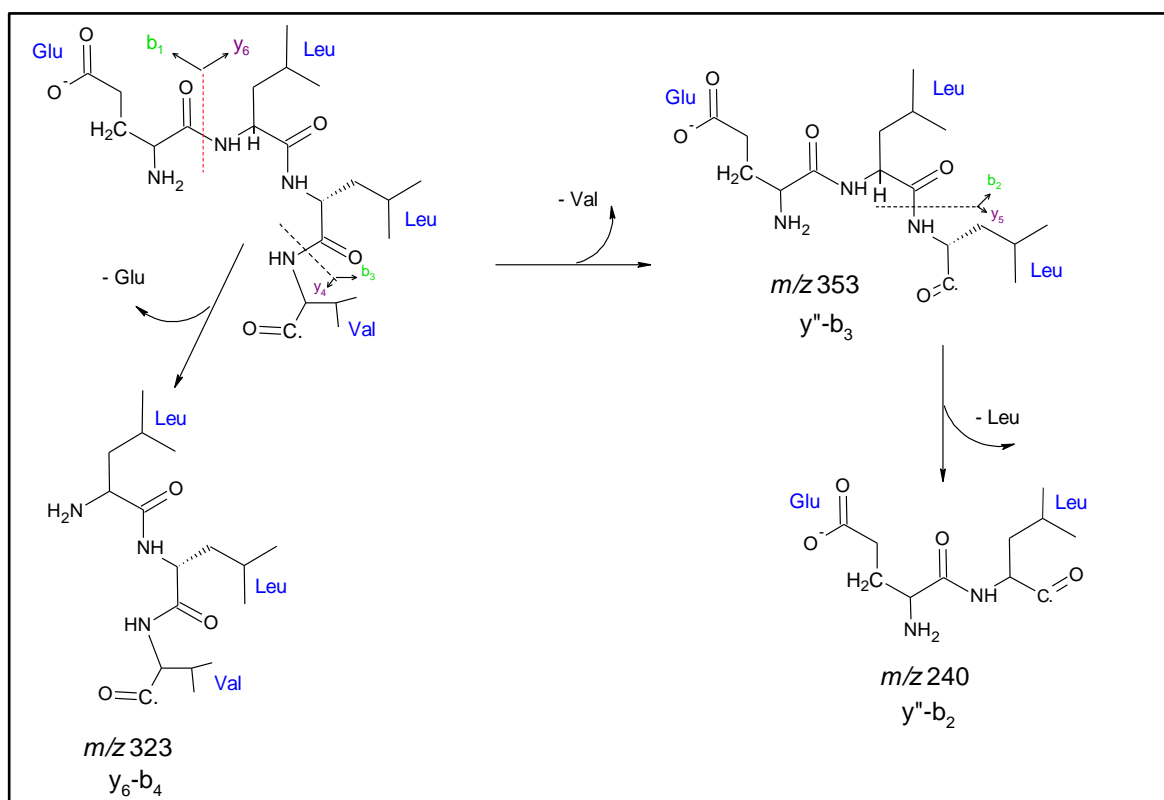
**Figura 28.** Proposta de fragmentação do íon de  $m/z$  692.

A segunda série peptídica contém os íons C-terminal de  $m/z$  452, 339, 353, 323 e 240. O íon de  $m/z$  339 corresponde à perda de Val-Leu-Leu-Glu-x, onde x é representado pela cadeia lateral do ácido graxo  $\beta$ -hidróxi. Em seguida, o íon de  $m/z$  452 ( $y''$ -b<sub>4</sub> referente ao tetrapeptídeo -Glu-Leu-Leu-Val-) é formado pela perda de x e dos resíduos de Leu-Leu-Asp- (Figura 29), podendo ainda gerar os fragmentos de  $m/z$  323



**Figura 29.** Proposta de fragmentação da surfactina para os íons de  $m/z$  452 e 339.

( $y_6$ -b<sub>4</sub> referente ao tripeptídeo -Leu-Leu-Val-) pela perda do ácido glutâmico (-129 Da), e o fragmento de  $m/z$  353 ( $y''$ -b<sub>3</sub> referente ao tripeptídeo Glu-Leu-Leu-) pela perda de Valina (-99 Da) e a perda de Leu (-113 Da) gerando o fragmento de  $m/z$  240 ( $y''$ -b<sub>2</sub> referente ao dipeptídeo -Glu-Leu-) (MORAN et al., 2010) (Figura 30).



**Figura 30.** Proposta de fragmentação da surfactina para os íons de  $m/z$  353, 323 e 240.

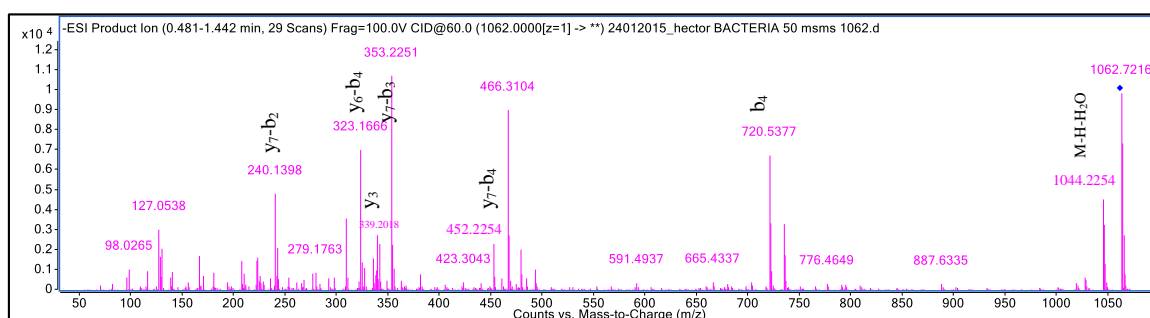
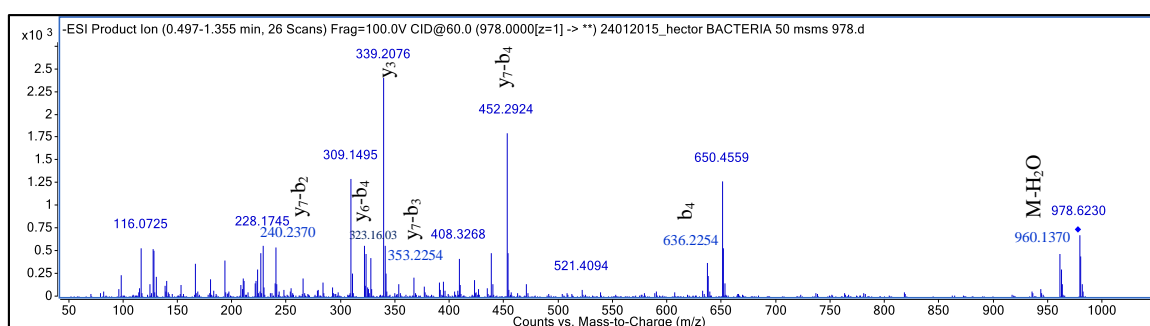
**Tabela 8.** Íons detectados por fragmentação (ESI-MS<sup>2</sup>) dos homólogos da surfactina a partir dos íons percusores [M - H]<sup>-</sup> de  $m/z$  978, 992, 1006, 1020, 1034, 1048, 1062 e 1076.

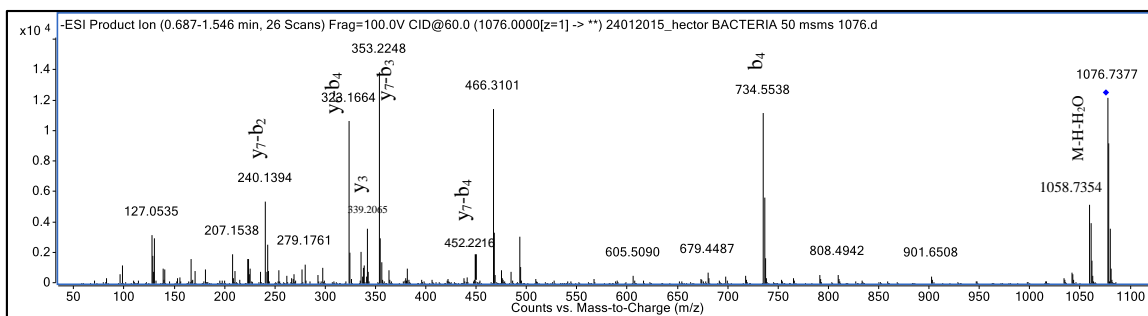
Produtos da série alifática	Frag	[M - H] <sup>-</sup> ( $m/z$ )							
		978	992	1006	1020	1034	1048	1062	1076
		C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>15</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>17</sub>	C <sub>18</sub>
[M - H - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>		960	974	988	1002	1016	1030	1044	1058
[M - H - Leu-Leu-Asp] <sup>-</sup>	b <sub>4</sub>	636	650	664	678	692	706	720	734
<b>Produtos da série peptídica</b>									
[M-H - x - /Leu - Leu - Asp] <sup>-</sup>	y''-b <sub>4</sub>	452	452	452	452	452	452	452	452
[M-H - x - /Leu-Leu - Asp-Val] <sup>-</sup>	y''-b <sub>3</sub>	353	353	353	353	353	353	353	353
[M-H - x-Glu- Leu-Leu-Val] <sup>-</sup>	y <sub>3</sub>	339	339	339	339	339	339	339	339
[M-H - x - Glu - /Leu - Leu - Asp] <sup>-</sup>	y <sub>6</sub> -b <sub>4</sub>	323	323	323	323	323	323	323	323
[M-H - x - /Leu-Leu-Asp-Val-Leu] <sup>-</sup>	y''-b <sub>2</sub>	240	240	240	240	240	240	240	240

x =cadeia lateral ácido graxo

De acordo com a proposta de fragmentação (Figura 27-30) é permitido estabelecer a sequência dos aminoácidos, sendo, N-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu-C para todos os homólogos obtidos, uma vez que, os fragmentos da série peptídica são os mesmos, apresentando diferenças apenas nos íons referente aos fragmentos da série N-terminal (Tabela 8). Por exemplo, para o homólogo  $m/z$  978, o íon  $b_4$  se diferencia em 14 Da, referente ao grupo metilênico (-CH<sub>2</sub>-) do íon correspondente do homólogo  $m/z$  992. A diferença de massa molar é a mesma (14 u) entre os picos correspondentes dos homólogos 992 e 1006, entre o 1006 e o 1020 e assim sucessivamente. Com esses dados, pode-se atribuir que a cadeia de ácido graxo varia de 11 a 18 átomos de carbono.

Na literatura não há relatos da identificação dos compostos de  $m/z$  978, 1062 e 1076, sendo, portanto, caracterizados neste trabalho como os homólogos C11, C17 e C18 da surfactina (Figura 31 e tabela 8). Sendo o homólogo C11 produzido pelas linhagens Gh Cc3 1.2a (LP17), GhCc1 2.1 (LP50), Folha BDA1.3.1 (LP76), Ppc12.2b (LP164), AnspR1 1.3 (LP207) e Dfga1. 1. 2 (LP229) e os homólogos C17 e C18 pela linhagem GhCc1 2.1 (LP50).





**Figura 31.** Espectros de ESI-MS<sup>2</sup> no modo negativo dos íons de  $m/z$  978, 1062 e 1076.

As análises de ESI-MS<sup>2</sup> no modo negativo permitiram confirmar os dados apresentados no modo positivo para os homólogos mais abundantes, no entanto, a partir da desprotonação foi possível observar a presença de três novos compostos ainda não relatados na literatura para a surfactina. Logo, foi possível caracterizar oito homólogos da surfactina sendo o C11 ( $m/z$  978), C12 ( $m/z$  992), C13 ( $m/z$  1006), C14 ( $m/z$  1020), C15 ( $m/z$  1034), C16 ( $m/z$  1048), C17 ( $m/z$  1062) e C18 ( $m/z$  1076).

## 5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

### 5.4.1 Teste de Christensen

O bioensaio pelo teste em culturas pareadas (Teste de Christensen) foi um ensaio preliminar que permitiu avaliar as atividades biológicas de antibiose, micoparasitismo e competição a partir dos metabólitos produzidos por bactérias endofíticas. A atividade antibiótica, ocorre pela interação desarmônica, onde uma espécie produz e libera substâncias que dificultam o crescimento ou a reprodução de outras causando a sua morte celular. Enquanto que a atividade de micoparasitismo (Figura 32-a), é uma forma comum de associação entre organismos, por meio do qual se estabelecem relações nutricionais favoráveis à existência do micoparasita, que pode ser principalmente: necrotrófica – o micoparasita mata o hospedeiro pelo contato direto, absorvendo seu conteúdo celular como fonte de nutrição; biotrófica – o micoparasita obtém nutrientes das células do hospedeiro, sem matá-las (INBAR & CHET, 1992). A atividade de competição (Figura

32-b), é a competição entre indivíduos de espécies diferentes por espaço e preferências alimentares idênticas.

Os resultados das linhagens de bactérias endofíticas bioensaiadas contra microrganismos patógenos de humanos estão representados na tabela 9. Para todas as linhagens testadas não houve antibiose, porém, os resultados observados foram destacados para competição (**cp**) e microparasitismo (**mcp**). As linhagens avaliadas apresentaram 99% de atividade de microparasitismo contra as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli* e 1% por atividade de competição, 51% apresentaram microparasitismo contra bactérias Gram-positivas *S. aureus* e 49% por competição, 53% de microparasitismo contra *E. faecalis* e 47% por competição, 52% atividade de microparasitismo contra *C. albicans* e 48% por competição.

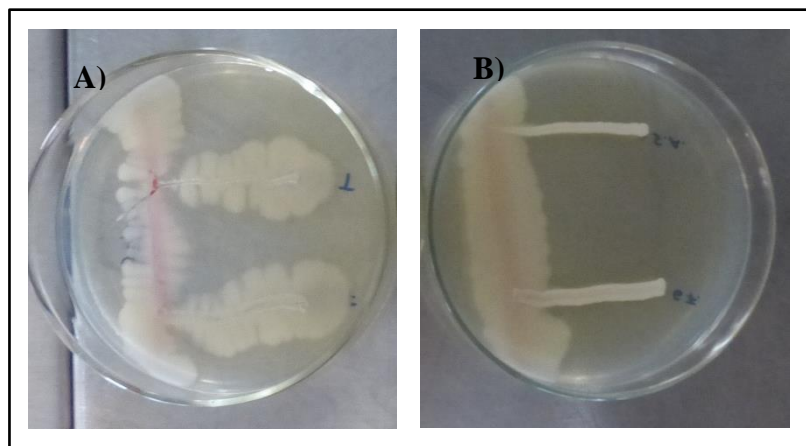
**Tabela 9.** Resultados do bioensaio em culturas pareadas (Metodologia de Christensen) das bactérias endofíticas contra patógenos humanos.

Cod.	Bactérias endofíticas	Microrganismos Patógenicos				
		<i>S. a</i>	<i>E. f.</i>	<i>P. a</i>	<i>E. c</i>	<i>C.a</i>
1	17   Gh Cc3 1.2 a	cp	cp	mcp	mcp	mcp
2	39   GhCr3 2.1.1	mcp	mcp	mcp	mcp	cp
3	41   Gh F1 1.2 bBB	cp	cp	mcp	mcp	cp
4	42   GhCr3 1.1a	mcp	mcp	mcp	mcp	cp
5	47   GhCg1 2.2b	mcp	mcp	mcp	mcp	cp
6	48   GhCc1 1.2d	cp	cp	mcp	mcp	cp
7	50   GhCc1 2.1a	cp	cp	mcp	mcp	mcp
8	54   Caule aveia + CT 1.4.1a	cp	cp	mcp	mcp	cp
9	56   Caule BDA + CT 1.1.1B	cp	cp	mcp	mcp	cp
10	59   Caule BDA + CT 1.1.1a	mcp	mcp	mcp	mcp	cp
11	63   BDA + CT Flor 2.4.1	cp	cp	mcp	mcp	mcp
12	64   BDA + CT Folha 2.4.1	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
13	65   Folha BDA 1.3.1	cp	cp	cp	cp	mcp
14	66   Flor 1.1.3b1	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
15	67   ISP2 + CT Folha 1.1.3	cp	mcp	mcp	mcp	mcp
16	68   MaO6 Caita 2.2.3	cp	cp	mcp	mcp	cp

17	73	BDA Caule	1.2.1	cp	mcp	mcp	mcp	mcp
18	76	Folha BDA	1.3.1a	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
19	81	Caule aveia	1.2.2	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
20	82	Folha aveia	1.4.1	cp	cp	mcp	mcp	mcp
21	84	Folha BDA	1.4.1	cp	cp	mcp	mcp	cp
22	91	MaO6 Caule TG	2.1.3	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
23	105	DgC2 1.1	s/assep.	mcp	mcp	mcp	mcp	cp
24	108	DgG1	1.3b	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
25	109	DgCc1	2.1	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
26	127	DgC1	3.3b s/ assep.	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
27	148	Stsp Cr2	3.3.1c	cp	cp	mcp	mcp	mcp
28	156	Stsp R2	1.3	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
29	158	Stsp R1	1.1	cp	cp	mcp	mcp	mcp
30	164	Ppc12.2b		mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
31	174	DgCr	1.2.3	cp	cp	mcp	mcp	cp
32	181	DgR1	2.2	cp	cp	mcp	mcp	cp
33	185	DgR2	1.2	mcp	mcp	mcp	mcp	cp
34	189	DgFr1	2.3c	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
35	191	DgFr1	2.3b	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
36	196	DgCr2	1.1b	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
37	207	AnspR1	1.3	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
38	222	AnspCr1	2.2c	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
39	223	AnspCg2	1.3	cp	cp	cp	cp	cp
40	224	Ansp C2	2.1c	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
41	229	Dfga	1.1.2	cp	cp	mcp	mcp	mcp
42	234	Dffg	1.1.2b	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp
43	239	Cosp R2	13 la7.B Ac	cp	cp	mcp	mcp	cp
44	243	Cosp R3	Bac. ac	mcp	mcp	mcp	mcp	cp
45	254	Cosp H	BDA 2 Ac	mcp	mcp	mcp	mcp	cp
46	257	Cosp R2	Bac. ac	mcp	mcp	mcp	mcp	cp
47	258	Cosp H	BDA ac	cp	cp	mcp	mcp	cp
48	259	Cosp R2	3.3 Cito	cp	cp	mcp	mcp	cp
49	264	Cosp H	Bac. Ac	cp	cp	mcp	mcp	cp
50	265	Fungo	2 solo 4	mcp	mcp	mcp	mcp	mcp

*P.a.*= *Pseudomonas aeruginosa*, *S.a.*= *Staphylococcus aureus*, *E.f.*= *Enterococcus faecalis*, *E.c.*=*Escherichia coli*, *C.a.*= *Cândida albicans*. (+) Antibiose, (mcp) Micoparasitismo, (cp) Competição, (-) nenhuma atividade.





**Figura 32.** Teste por culturas pareadas (Metodologia de Christensen) para a bactéria endofítica, linhagem 17 (GhCc3.1.2. (A) Atividade de microparasitismo, contra as bactérias patogênicas *P. aeruginosa* e *E. coli* e (B) Atividade de competição contra *S.aureus* e *E. faecalis*.

Desta forma, as linhagens 64, 66, 76, 81, 91, 108, 109, 127, 156, 164, 189, 191, 196, 207, 222, 224, 234, 265 destacaram-se por apresentar microparasitismo contra todas as bactérias patogênicas, e contra *C. albicans*, o que as faz agentes de controle biológico (Tabela 9). Em estudos realizados, Benchimol e colaboradores (2000) testaram o efeito de bactérias endofíticas isoladas de plântulas de pimenta-do-reino na redução da mortalidade causada por fusariose, enfermidade provocada pelo fungo *Fusarium solani*, e detectaram que a espécie *Methylobacterium radiotolerans* controlou o patógeno, causando redução significativa do número de plantas mortas.

No trabalho de Shiomi et al. (2006), foram selecionados isolados de bactérias endofíticas de folhas e ramos de cafeeiro com potencial para o controle biológico da ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*. Alguns isolados foram eficientes em controlar a ferrugem do cafeeiro, embora outros tenham aumentado a severidade da doença.

Silva et al. (2008) selecionaram isolados de bactérias endofíticas de diferentes espécies e gêneros obtidos de folhas e haste de tomateiro e pimentão para o controle da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae*) do tomateiro; as espécies bacterianas mais

eficazes na redução da severidade da pinta bacteriana foram *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus sphaericus*, *B. amyloliquefaciens* e *Staphylococcus aureus*.

#### 5.4.2 Avaliação da atividade antibiótica dos extratos dos sobrenadantes por difusão em ágar.

Os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos contra bactérias e levedura patogênicas são mostrados na tabela 10.

**Tabela 10.** Resultados do teste de antibiose em difusão em ágar dos extratos das bactérias endofíticas e os principais íons detectados por ESI-MS<sup>2</sup>

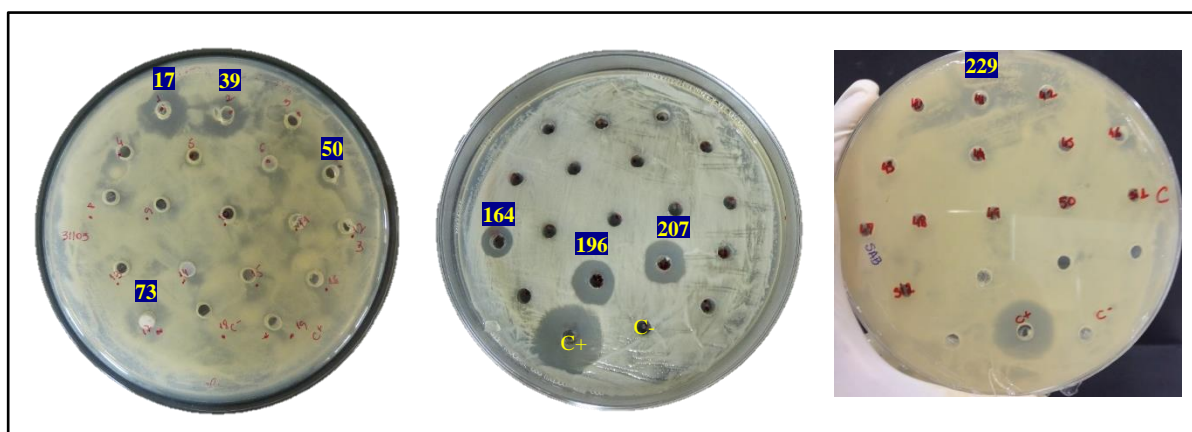
Extratos LP	<i>C. albicans</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>		Principais íons detectados
			Gram-positiva				Gram-negativa				
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	
17	18	18	12	12	-	-	10	-	12	-	C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18
39	16	16	-	-	-	-	-	-	-	-	C11
41	-	-	7	7	12	-	-	-	-	-	C12, C18
42	-	-	13	13	-	-	12	-	15	-	C12, C13, C14, C15, C16, C18
50	15	15	10	10	12	-	*	*	*	*	C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18
66	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-	C13, C14, C15, C16
73	16	16	-	-	-	-	-	-	-	-	C11, C14, C15
84	-	-	-	-	-	-	12	12	-	-	C12, C13, C14, C15, C16
164	15	15	-	-	-	-	19	19	-	-	C11, C12, C13, C14, C15, C16
196	19	19	-	-	-	-	11	-	-	-	C11, C12, C13, C14, C15, C16
207	19	19	-	-	-	-	18	18	-	-	C11, C12, C13, C14, C15, C16

229	12	12	-	-	-	-	15	15	-	-	C11, C12, C13, C14, C15, C16
259	-	-	33	33	-	-	-	-	-	-	C18
Controle	Nistatina (2 mg/mL)		Ampicilina (2 mg/mL)		Ampicilina (2 mg/mL)		Tetraciclina (2mg/mL)		Ciprofoxacia (2mg/mL)		
	25	25	35	35	40	40	30	30	33	33	

Valores do diâmetro dos halos de inibição média de três repetições (mm); - : Ausência de inibição; \*: Teste não realizado por falta de amostra.

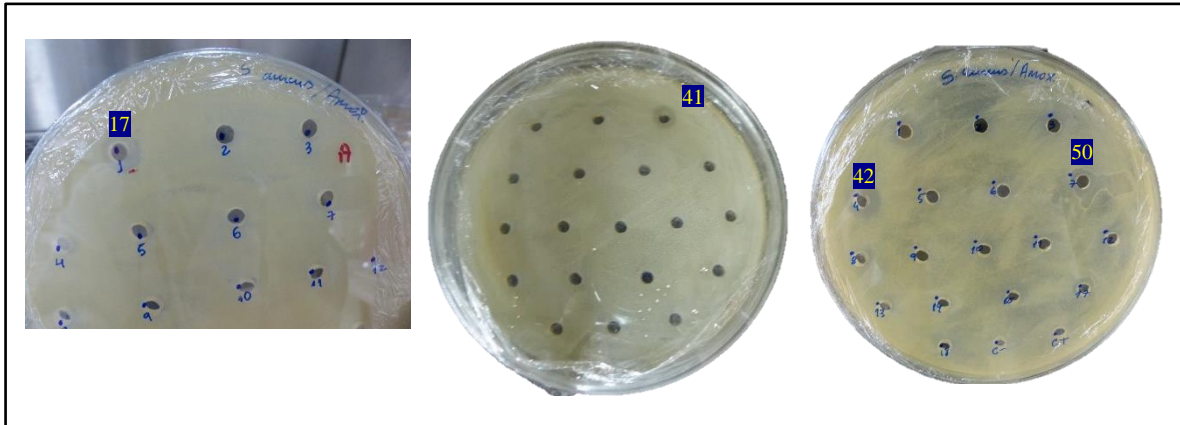
Os resultados do método de difusão em ágar mostraram que a atividade antimicrobiana dos extratos LP (Tabela 10) foram inferiores para *C. albicans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *E. coli* quando comparado com os valores médios dos antibióticos utilizados como controle para cada organismo testado (nistatina 25 mm, ampicilina 35 mm, tetraciclina 30 mm, ampicilina 40 mm e ciprofoxacina 30 mm) respectivamente.

Os extratos LP 17, 39, 50, 73, 164, 196, 207 e 229 foram capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* em teste, formando halos de 12 a 19 mm (Figura 33).



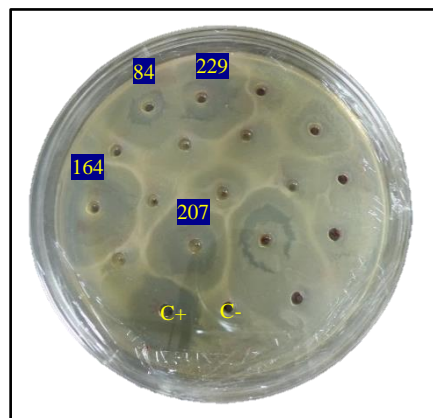
**Figura 33.** Halos de inibição de *C. albicans* dos extratos LP 17, 39, 50, 73, 164, 196, 207 e 229 após 48 horas.

Enquanto que os extratos LP 17, 41, 42, 50 e 259 contra *S. aureus* apresentaram halos de inibição de 7 a 33 mm (Figura 34).



**Figura 34.** Halos de inibição de *S. aureus* dos extratos LP 17, 41, 42 e 50 após 48 horas.

Para os halos de inibição contra *P. aeruginosa* os extratos LP 84, 164, 207 e 229 apresentaram valores de 10 a 18 mm (Figura 35). Enquanto que, as amostras 17, 42, 66 e 196 apresentaram halos de inibição entre 10 a 15 mm apenas em 24 h, não sendo observado inibição após o período de 48 h. Logo, a atividade destas amostras contra *P. aeruginosa* é bacteriostático, ou seja, inibe a princípio o crescimento do patógeno, mas não é capaz de causar a morte celular do mesmo. Isto também foi observado nas amostras LP17 e 42, contra *E. coli*, e LP41 e 50 contra *E. faecalis*.

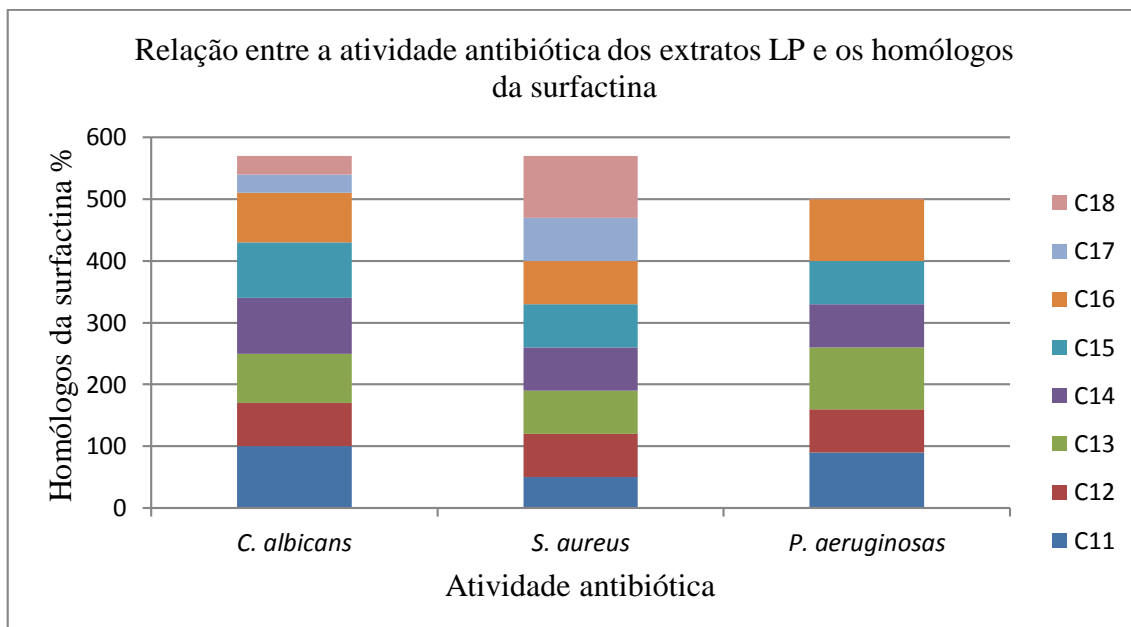


**Figura 35.** Halos de inibição de *P. aeruginosa* dos extratos LP 84, 164, 207 e 229 após 48 horas.

De todos os resultados apresentados contra os patógenos testadores, os testes contra *C. albicans* apresentaram melhor nitidez dos halos, podendo ter assim, uma melhor

inibição. As amostras LP39, LP84 e LP259 apresentaram inibição específica contra *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* respectivamente. Esta especificidade, pode estar diretamente relacionada com as interações dos homólogos da surfactina produzidos por estas linhagens (Tabela 10). A linhagens LP259 apresentou inibição (33mm) próximo ao antibiótico padrão ampicilina (35 mm), tendo, portanto, uma excelente atividade antibiótica por ainda se tratar de um extrato bruto.

Em todas as amostras que apresentaram atividade antibiótica, foi possível detectar neste trabalho, a partir da espectrometria de massas, a presença da surfactina. Estes dados estão de acordo com a literatura, onde tem apresentado este lipopeptídeo com um grande espectro de atividade, incluindo antifúngica e bactericida (ULLRICH et al., 1991; GANG et al., 2011; YUAN, et al., 2012). Os homólogos C11, C12, C13, C16 e C18 foram os mais detectados nas amostras com atividade biológica positiva (Figura 36). O homólogo C11 é detectado em todas as amostras (LP17, 39, 50, 73, 164, 196, 207 e 229) que apresentaram resultados positivos contra *C. albicans* (Tabela 10), não sendo detectado nas demais amostras com resultados negativos. Isto pode indicar que este homólogo pode ser o responsável pela atividade biológica contra a levedura. O mesmo ocorre para o homólogo C18 contra *S. aureus*, pois em todas as amostras (17, 41, 50, 259) que apresentaram atividade, este homólogo foi detectado, não sendo observado nas demais com resultados negativos. Nos resultados para *P. aeruginosa*, os homólogos C13 e C16 quando comparados entre os resultados positivos e bacteriostático (LP 66 e 196), foram os mais frequentes.



**Figura 36.** Relação da atividade de antibiose dos extratos LP da tabela 12 com os homólogos da surfactina.

Estudos realizados por Fernandes e colaboradores (2007) relatam que amostras contendo lipopeptídeos incluindo a surfactina produzidos por *Bacillus subtilis* R14 resultou na atividade antimicrobiana contra as bactérias patogênicas *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* e para *P. aeruginosa* tendo melhor atividade contra a bactéria Gram positiva *S. aureus*, observado também neste trabalho, uma vez que, a melhor atividade antimicrobiana foi apresentada pelo extrato LP 259 contra *S. aureus* com halo de inibição de 33 mm, sendo bem próximo ao antibiótico padrão ampicilina com halo de 35 mm (Tabela 10).

Segundo Ullrich e colaboradores (1991), entre os vários peptídeos existentes, os lipopeptídios são bem conhecido por inibir o crescimento de fungos e bactérias incluindo patógenos humanos. Para este efeito, a daptomicina (cubicin), um lipopeptídeo aniônico já tem sido usado para aplicações terapêuticas, sendo eficaz contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* (HEINZELMANN et al., 2005; NGUYEN, et al., 2006), bem como sensíveis a *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*, e *S. dysgalactiae* (STRAUS, et al., 2006). Outro lipopeptídeo antibiótico descrito por Aretz e colaboradores (2000) é a

friumilicina produzido do actinomiceto *Actinoplanes friuliensis*, sendo um agente efetivo contra bactéria Gram-positivo, *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus*.

Recentemente têm sido descritos na literatura outros novos lipopeptídeos também com uma elevada atividade antimicrobiana, o Paenibacterin isolado de *Paenibacillus thiaminolyticus* com atividades antimicrobianas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella enterica* (GUO, et al., 2012; HUANG et al., 2014), o Kannurin isolado de *Bacillus cereus* com atividade antifúngica (AJESH, et al., 2013), Subtulene A, isolado de *Bacillus subtilis* SSE4 com atividades antifúngicas contra *Colletotrichum gloeosporioidese* e *Sclerotium rolfsii* e antibacteriana contra *P. aeruginosas* (THASANA et al., 2010).

Das e colaboradores (2008) também relataram que a surfactina produzida por *Bacillus circulans* tem sido ativa contra bactérias multirresistentes, como *Alcaligenes faecalis*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus* resistentes a metilina, com concentração mínima inibitória inferior aos antibióticos convencionais utilizados.

Acredita-se que a atividade antimicrobiana da surfactina seja consequência direta da interação forte e profunda deste lipopetídeo na membrana alvo e de sua ação sobre a estabilidade de bicamada (CARRILLO et al., 2003) causando alterações na integridade da mesma (PEYPOUX et al., 1999). Estas interações são mais intensas no caso de fosfolipídeos com cadeia hidrocarbônica semelhante à da surfactina em relação ao número de carbonos. A surfactina forma “clusters” com os fosfolipídeos, estabelecendo domínios de surfactina dentro da bicamada (KNOBLICH et al., 1995; GRAU et al., 1999). Esta molécula pode ainda formar, nas bicamadas, agregados micelares com organização lamelar ou pequenas vesículas fechadas, que podem solubilizar a membrana biológica, atuando como um detergente nesta estrutura (KNOBLICH et al., 1995; GRAU et al., 1999; CARRILLO et al., 2003). Esta atividade na membrana ocorre devido à

surfactina possuir uma estrutura com caráter anfipático, que compreende uma face hidrofóbica formada por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (quatro Leu e uma Val) e uma face hidrofílica com os dois grupos carboxílicos formada pelos resíduos ácidos Glu e Asp e uma cadeia de ácido graxo. Ao penetrar na bicamada, comprimento da cadeia lipídica e a cabeça polar cíclico da surfactina promove a sua inserção na interface hidrofóbica da membrana desestabilizando-a através da formação de poros condutores de íons, que compromete o equilíbrio eletroquímico da membrana, explicando a possível ação antimicrobiana destas moléculas (CARRILLO et al., 2003; HEERKLOTZ et al., 2004).



## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS**

Neste trabalho entre as 50 linhagens de bactérias endofíticas amazônicas pré-selecionadas pelo teste de coloração Sudan Black, foram identificadas por espectrometria de massas, 25 produtoras de lipopeptídeos da classe das surfactinas.

Em ensaios pela metodologia de Christensen foi observado que essas linhagens apresentam atividades de microparasitismo e competição frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans* enquanto que pelo método de difusão em ágar, 13 extratos destas linhagens apresentaram antibiose frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

Na análise dos espectros de massas obtidos por ESI-ITMS no modo positivo foi observado um alto grau de semelhança dos extratos de lipopeptídeos dessas 25 linhagens, tendo sido identificados quatro homólogos da surfactina;

A análise dos espectros de alta resolução obtidos por ESI-MS<sup>2</sup> no modo negativo confirmou a semelhança dos extratos de lipopeptídeos dessas linhagens, porém revelou a presença minoritária de mais quatro homólogos da surfactina em diversos extratos;

Uma das amostras (LP50) apresentou o maior número de homólogos da surfactina, incluindo todos os observados nas outras amostras, três dos quais, C11, C17 e C18 ainda não foram relatados na literatura;

Embora os espectros de massas obtidos no modo positivo são os mais utilizados para a caracterização de lipopeptídeos, os estudos deste trabalho demonstraram que o uso da espectrometria de massas no modo negativo pode ser uma ferramenta viável na elucidação de homólogos da surfactina, dadas as presenças do ácido glutâmico (Glu) e ácido aspártico (Asp).

Este é o primeiro estudo químico e biológico de lipopeptídeos obtidos de bactérias endofíticas na região e os resultados obtidos ressaltam a importância das investigações de microrganismos endofíticos como fontes de produtos naturais.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ACKERMANN, G.; RODLOFF, A.C. Drugs of the 21st century: Telithromycin (HMR 3647) the first ketolide. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, p. 497–511, 2003.

AJESH, K.; SUDARSLAL, S.; ARUNAN, C.; SREEJITH, K. Kannurin, a novel lipopeptide from *Bacillus cereus* strain AK1: isolation, structural evaluation and antifungal activities. *Journal of Applied Microbiology*, v. 115, n. 6, p. 1287-1296, 2013.

ALVAREZ, F.; CASTRO, M.; PRINCIPE, A.; BORIOLI, G.; FISHER, S.; MORI, G.; JOFRE, E. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturina or surfactina and fengycin are effective in biocontrol of *sclerotinia* stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, v. 112, p. 159-174, 2012.

ANDREAZZA, H. J.; WANG, T. F.; BILUSICH, D. Negative ion fragmentations of deprotonated peptides containing post-translational modifications: diphosphorylated systems containing Ser, Thr and Tyr, A characteristic phosphate/ phosphate cyclisation, A joint experimental and theoretical study. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 23, p.1825–1833, 2009.

ARAÚJO, W. L.; LACAVAL, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; KUKLIMSKY-SOBRAL, J.; KLEINERPIZZIRANI, A. A.; AZEVEDO, J. L. (Coord.). *Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos*. Piracicaba: CALQ, 2010.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI, J. R. W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interaction between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 229- 236, 2001.

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, J. R. W.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, W. J. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 4906-4914, 2002.

ARETZ, W.; MEIWES, G.; SEIBERT, G.; VOBIS, G.; WINK, J. Friumilicins: novel lipopeptide antibiotics with peptidoglycan synthesis inhibiting activity from *Actinoplanes friuliensis* sp. Nov. i. Taxonomic studies of the producing microorganism and fermentation. *Journal of Antibiotics*, v. 53, p. 807-815, 2000.

ARIMA, K., KAKINUMA, A., TAMURA, G., Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 31. p. 488, 1968.

ASHBOLT, N. J.; INKERMAN, P.A. Acetic acid bacterial biota of the pink sugar cane mealybug *Saccharococcus sacchari*, and its environs. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 56, p.707–712, 1990.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p. 117-137.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; MACHERONI Jr, W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle Biológico. Jaguariúna: EMBRAPA – Meio Ambiente, 2000. p. 57-59.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Eds.). Fungi: multifaceted microbes. New Delhi: Anamaya Publishers, 2007.

BALDANI, J. L. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biology Biochemistry, Oxford, v. 9, p. 911-922, 1997.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; JÚNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. Química Nova, v. 30, n. 2, 2007.

BENCHIMOL, R. L.; CHU, E. Y.; YUITIMUTO, R.; DIAS-FILHO, M. B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e respostas morfofisiológicas. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 35, n. 7, p. 1343-1348, 2000.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. Journal of Antibiotics, v. 58, p. 1-26, 2005.

BOCHOW, H. Mode of action and practical use of the *Bacillus subtilis* as complex acting bioproduct. In: MANKA, M (ED.). Environmental biotic factors in integrated plant disease control. Poznan: The Polish Phytopathological Society, p. 97-104, 1995.

BONMATIN, J. M.; LABBÉ, H.; GRANGEMARD, I.; PEYPOUX, F.; MAGET DANA, R.; PTAK, M.; MICHEL, G. Production, isolation and characterization of [leu4] and [ileu4] surfactins from *Bacillus subtilis*. Letters in Peptides Science, v. 2, p. 41- 47, 1995.

BONMATIN, J. M.; LAPREVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity structure relationships to design new bioactive agents. Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening, v. 541 n. 6, p. 556, 2003.

BORGES, W. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation. Current Organic Chemistry v.13, p. 1137-1163, 2009.

BRAHMACHARI, G. Natural products in drug discovery: impacts and opportunities-an assessment In: Brahmachari G., editor. Bioactive natural products: opportunities and challenges in medicinal chemistry. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.; Singapore, 2012, pp. 1-200.

BROSS, P. F.; BEITZ, J.; CHEN, G.; CHEN, X. H.; DUFFY, E.; KIEFFER, L.; ROY, S. SRIDHARA, R.; RAHMAN, A.; WILLIAMS, G.; PAZDUR, R. Approval summary: Gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. Clinical Cancer Research V. 7, P. 1490–1496, 2001.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WUEFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: Um guia prático. *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CARDOSO, B. C. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos) - Universidade do Minho, Braga.

CARRILLO, C.; TERUEL, J. A.; ARANDA, F. J.; ORTIZ, A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochemica et Biophysica Acta*, v.1611, p.91-97, 2003.

CASTILLO, U.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. In *Microbiology*, v. 148, p. 2675-2685, 2002.

CAVALCANTI, S. M. M.; FRANÇA, E. R.; VILELA, M. A.; MONTENEGRO, F.; CABRAL, C.; MEDEIROS, A. C. R. Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. *Revista brasileira de epidemiologia*. São Paulo, v. 9, n. 4, Dec. 2006

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy Sciences, USA*, v 100, p. 14555-14561, 2003.

CHALLIS, G.L.; NAISMITH, J. H. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology*, v.14, p.748-756, 2004.

CHAMRAD, D. C.; KORTING, G.; STUHLER, K.; MEYER, H. E.; KLOSE, J.; BLUGGEL, M. *Proteomics*, v.619, n. 4, 2004.

CHEN, H. L.; CHEN, Y. S.; JUANG, R. S. Separation of surfactin from fermentation broths by acid precipitation and two-stage dead-end ultrafiltration processes. *Journal of membrane science*, v. 299, n. 1, p. 114-121, 2007.

CHEN, H. Y.; LIVERMORE, D. M. *In vitro* activity of biapenem, compared with imipenem and meropenem, against *Pseudomonas aeruginosa* strains and mutants with known resistance mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 33, p. 949–958, 1994.

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

CHIOCCHINI, C. The surfactin biosynthetic complex of *Bacillus subtilis*: COM domain-mediated biocombinatorial synthesis, and single step purification of native multi-modular NRPSs and multi-enzyme complexes. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften, Marburg/Lahn, Germany*, 2006.

CHISTENSEN, M.J., LATCH, G.C.M. and Tapper, B.A. Variation within isolates of *Acremonium* endophytes from perennial ryegrasses. *Mycological Research*, v. 95, p. 918-923, 1991.

CHO, K. M.; MATH, R. K.; HONG, S. Y.; ISLAM, S. M. A.; MANDANNA, D. K.; CHO, J. J.; YUN, M. G.; KIM, J. M.; YUN, H. D. Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauc (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. *Food Control*, Oxford, v. 20, p. 402-406, 2009.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*, v. 24, n.12, p. 1541- 1550, 2006.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. *Nature*, v. 432, p. 829-837, 2004.

CONLIN, A.; FORNIER, M.; HUDIS, C.; KAR, S.; KIRKPATRICK, P. Ixabepilone. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 6, p. 953–954, 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, P. M. Occurrence of endophytic bacteria in *Siphonous algae*. *Phycologia*, Padova, v.17, p.148-151, 1978.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 408 n. 42, 1981.

COSMINA, P.; RODRIGUEZ, F.; DE FERRA, F.; GRANDI, G.; PEREGO, M.; VENEMA, G. & VAN SINDEREN, D. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, v.8, p.821-831, 1993.

DARKES, M. J. M.; PLOSKER, G. L. Cefditoren pivoxil. *Drugs*, v. 62, p. 319–336, 2002.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEM, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, n. 6 p.1675–1684, 2008.

DELEU, M.; RAZAFINDRALAMBO, H. ; POPINEAU, Y. ; JACQUES, P. ; THONART, P. ; PAQUOT, P. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 152, ed. 1-2, p. 3-10, 1999.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, v. 62, p. 5-16, 2009.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DI FIORI, S.; DEL GALLO, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plant. In: FENDRIK, I. *et al.* *Azospirillum* VI and Related Microorganisms. pp. 1 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1995.

DU, L.; CHEN, M.; SANCHEZ, C.; SHEN, B. An Oxidation Domain in the BImIII Nonribosomal Peptide Synthetase Probably Catalyzing Thiazole Formation in the Biosynthesis of the Antitumor Drug Bleomycin in *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *FEMS Microbiology Letters*, v.189, p.171-175, 2000.

EAMAN, M.; BERQUAND, A.; DUFRENE, Y. F.; PAQUOT, M.; DUFOUR, S.; DELEU, M. Penetration of surfactin into phospholipid monolayers: Nanoscale interfacial organization. *Langmuir*, v. 22, p. 11337-11345, 2006.

ETCHEGARAY, A.; DE CASTRO BUENO, C.; DE MELO I. S.; TSAI, S. M.; FIORE, M. F.; SILVA-STENICO, M. E.; DE MORAES, L. A. B.; TESCHKE, O. Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Archives of microbiology*, v. 190, n. 6, p. 611-622, 2008.

FELLER, I. C. Effects of nutrient enrichment on growth and herbivory of dwarf red mangrove (*Rhizophora mangle*). *Ecological Monographs*, v. 65, p. 477-505, 1995.

FERNANDES, P. A. V.; ARRUDA, I. R.; SANTOS, A. F. A. B.; ARAÚJO, A. A.; MAIOR, A. M. S.; XIMENES, E. A. Anyimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 704-709, 2007.

FOCACCIA, R. V. *Tratado de Infectologia*. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 984-989, 2005.

FRANTZ, S. 2003 approvals: A year of innovation and upward trends. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 103-105, 2004

FRANTZ, S.; SMITH, A. New drug approvals for 2002. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, p. 95-96, 2003.

GALES, A. C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N.; SANDER, H. S. Antimicrobial resistance among Gram-negative *Bacillus* isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v. 73, n. 4, p. 60-354, 2012.

GALES, A. C.; TORRES, P. L.; VILARINHO, D. S.; MELO, R. S.; SILVA, C. F. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a intensive care unit of a teaching hospital. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 4, p. 267-271, 2004.

GANG, H. Z.; LIU, J. F.; UM, B. Z. Molecular dynamics study of surfactina monolayer at the air/ water interface. *The Journal of Physical Chemistry B*. v.115, p. 12770-12777, 2011.

GILES, F.; ESTEY, E. O'BRIEN, S. Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leucemia. *Cancer*, v. 98, p. 2095-2104, 2003.



GOLDBERG, J. B. Why is *Pseudomonas aeruginosa* a pathogen? F1000. Molecular Biology Reports, v. 29, n. 2, p. 1-4, 2010.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes, Review of Microbiology, v. 37, p. 24-32, 1983.

GORE, M. E. Temsirolimus in the treatment of advanced renal cell carcinoma. Annals of Oncology, v. 18, n. 9 p. 87-88, 2007.

GRAU, A.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; PEYPOUX, F.; ORTIZ, A. A study on the interactions of surfactina with phospholipid vesicles. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1418, p. 307-319, 1999.

GRAU, A. GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; PEYPOUX, F.; ORTIZ, A. Aggregational Behavior of Aqueous Dispersions of the Antifungal Lipopeptide Iturin A. Peptides, v. 22, p. 1-5, 2001.

GRAUL, A. I. The Year's New Drugs. Drug News & Perspectives, v. 15, p. 29-43, 2002

GRAUL, A. I. The Year's New Drugs. Drug News & Perspectives, v. 17, p. 43-57, 2004

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. Soil Biology and Biochemistry, n.37, p.395-412, 2005.

GROSS, H. Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. Applied microbiologia and biotechnology, v. 75, p. 267-, 2009.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância e perspectivas para a descobertas e desenvolvimento de novos agentes. Química Nova, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganirns: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. Journal of Nature Products, v. 69, p. 509-526, 2006.

GUO, Y.; HUANG, E.; YUAN, C.; ZHANG, L.; YOUSEF, A. E. Isolation of a Paenibacillus sp. Strain and Structural Elucidation of Its Broad- Spectrum Lipopeptide Antibiotic. Applied and Environmental Microbiology, v. 78, n. 9, p. 3156-3165, 2012.

HALLMANN, J., QUANDT-HALLMANN A., MAHAFFE, W. F., KLOEPPER J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology, v. 43 n.10, p. 895-914, 1997.

HANCOCK, R. E.; SPEERT, D. P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. Drug Resistance Updates, v. 4, p. 29-70, 2000.

HARVEY, A. L. Natural Products in Drug Discovery. *Drug Discovery Today*, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.

HARRISON, A. G, YOUNG, A. B. Fragmentation reactions of deprotonated peptides containing aspartic acid. *International Journal Mass Spectrometry*, p. 255–256: 111–122, 2006

HATHOUT, Y.; RYZHOV, V.; DEMIREV, P.; FENSELAU, C. Kurstakins: a new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1492-1496, 2000.

HEERKLOTZ, H.; WIEPRECHT, T.; SEELIG, J. Membrane perturbation by the lipopeptide Surfactin and detergents as studied by Deuterium NMR. *Journal of Physical and Chemistry B*, v. 108, p. 4909-4915, 2004.

HEINZELMANN, E.; BERGER, S.; MÜLLER, C.; HÄRTNER, T.; PORALLA, K.; WOHLLEBEN, W.; SCHWARTZ, D. An acyl-CoA dehydrogenase is involved in the formation of the cis3 double bond in the acyl residue of the lipopeptide antibiotic friumilicin in *Actinoplanes friuliensis*. *Microbiology*, v. 151, p. 1963-1974, 2005.

HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. *Nature Chemical Biology*, v.5, p. 450-452, 2009.

HINTON, D. M.; BACON, C. W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of com. *Mycopathologia*, v. 129, p. 117-125, 1995.

HORNER, R.; LISCANO, M. G. H.; MARASCHIN, M. M.; SALLA, A.; MENEGHETTI, B.; FORNO, N. L. F. D.; RIGHI, R. A. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 41, n. 6, p. 391-395, 2005.

HSIEH, F., LIN, T., MENG, M., KAO, S. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturina A, *Current Microbiology*, v. 56, p. 1-5, 2008.

<http://lib.jiangnan.edu.cn/asm/078> acesso em 16/08/15.

<http://www.floriental.org/293186-enterococcus-faecalis-on-agar> acesso em 17/08/15.

<http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xec/xec03-04.html> acesso em 17/08/15.

<http://www.geniebio.ac-aix-marseille.fr/biospip/spip/> - acesso em 16/08/15.

<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com.br/2009/12/candida-albicans.html> acesso em 17/08/15.

HUANG, E.; YOUSEF, A. E. The Lipopeptide Antibiotic Paenibacterin Binds to the Bacterial Outer Membrane and Exerts Bactericidal Activity through Cytoplasmic Membrane Damage. *Applied and Environmental Microbiology*, v.80, n. 9, p. 2700-2704, 2014.

HUNT, D. F.; YATES, J. R.; SHABANOWITZ, J.; WINSTON, S.; HAUER, C. R. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* v.17, 6233- 6237, 1986.

INBAR, E. GREEN, F. J.; HADAR, Y.; MINZ, D., Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of streptomycetes. *Microbial Ecology*, v. 50, p. 71-81, 2005.

JACOBS, M. J.; BUGBEE, W. M.; GABRIELSON, D. A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 63, p. 1262-5, 1985.

JACQUES, P. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In: SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (Editor) *Biosurfactants*, v. 20. Springer-Verlag: Berlin, 2011, p. 57-91.

JARVIS, B.; FRIGGITT, D.P.; SCOTT, L. J. Micafungin. *Drugs*, v. 64, p. 969–982, 2004.

JOUAULT, T.; SARAZIN, A.; MARTINEZ-ESPARZA, M.; FRADIN, C.; SENDID, B.; POULAIN, D. Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. *Cellular Microbiology*, Oxford, v. 11, n. 7, p. 1007–1015, 2009.

KAMEDA, Y. et al. Antitumor Activity of *Bacillus natto*. Isolation and Characterization of Surfactin in the Culture Medium of *Bacillus natto* KMD 2311. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 22, n. 4, p. 938-944, 1974.

KIM, K.; JUNG, S. Y.; LEE, D. K.; JUNG, J. K.; PARK, J. K.; KIM, D. K.; LEE, C. H. Suppression of Inflammatory Responses by Surfactin, a Selective Inhibitor of Platelet Cytosolic Phospholipase A2. *Biochemical Pharmacology*, v. 55, p. 975-985, 1998.

KIM, H., YOON, B., LEE, C., SUH, H., OH, H., KATSURAGI, T., TANI, Y.J. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.84, p.41-46, 1997.

KIM, K. M., LEE, J. Y., KIM, C. K., KANG, J. S. Isolation and Characterization of Surfactin Produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. *Archives of Pharmacal Research*, v. 32, p. 711-715, 2009.

KLUEPFEL, D. A. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 31, p.441–472, 1993.

KNIGHT, V.; SAGLIER, J. J.; DiTULLIO, d.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifyng microbial natural products for drug discovery. *Nature Reviews and Biotechnology*, v. 62, p. 446-458, 2003.

KNOBLICH, A.; MATSUMOTO, M.; ISHIGURO, R.; MURATA, K.; FUJIYOSHI, Y.; ISHIGAMI, Y.; OSMAN, M. *Colloids and Surfaces B*, v. 5, p. 43-48, 1995.

KONZ, D., MARAHIEL, M.A. How do peptide synthetases generate structural diversity. *Chemistry & Biology*, v.6, p.39-48, 1999.

KOUMOUTSI, A.; CHEN, X. H.; HENNE, A. et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, v. 186, p.1084–1096, 2004.

KREBS, B.; HÖDING, B.; KÜBART, S.; ALEMAYEHU-WORKIE, M.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; GROSCHE, R.; BOCHOW, H.; HEVESI, M. Use of *Bacillus subtilis* as biological control agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Plant Disease and Protection*, v. 105, p. 18-197, 1998.

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E. L.; PICKFORD, R.; DERRICK, J. P.; LAMERS, G. E. M.; THOMAS-OATES, J. E.; LUGTENBERG, B. J. J.; BLOEMBERG, G. V. Characterization of Two *Pseudomonas putida* Lipopeptide Biosurfactants, Putisolvin I and II, Which Inhibit Biofilm Formation and Break Down Existing Biofilms. *Molecular Microbiology*, v. 51, n. 1, p. 97-113, 2004.

LAMBALOT, R. H.; GEHRING, A. M.; FLUGEL, R. S.; ZUBER, P.; LACELLE, M.; MARAHIEL, M. A.; REID, R.; KHOSLA, C.; WALSH, C.T. A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry and Biology*, v. 3, p.923-936, 1996.

LAMBERT, M. L.; SUTENS, C.; SAVEY, A.; PALOMAR, M.; HIESMAYR, M. MORALES, I. AGODI, A.; FRANK, U.; MERTENS, K.; SCHUMACHER, M.; WOLKEWITZ, M. Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 11, n. 1, p. 8-30, 2011.

LANG, S. Biological Amphiphiles (Microbiol Biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 7, p. 12-20, 2002.

LAOHAVALEESON, S.; KUTI, J.L.; NICOLAU, D.P. Telavancin: A novel lipoglycopeptide for serious Gram-positive infections. *Expert Opinion Investigational Drugs*, v. 16, p. 347–357, 2007.

LEE, Y.K.; KIM, S.B.; PARK, C.S.; KIM, J.G.; OH, H.M.; YOON, B.D.; KIM, H.S. Chromosomal integration of *sfp* gene in *Bacillus subtilis* to enhance bioavailability of hydrophobic liquids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.67, p.789-794, 2005.

LEE, S. C.; KIM, S. H.; PARK, I. H.; CHUNG, S. Y.; CHOI, Y. L. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil emulsifying activity. *Archives of Microbiology*, v. 188, p. 307-312, 2007

LEFKOVE, B.; GOVINDARAJAN, B.; ARBISER, J.L. Fumagillin: An antiinfective as a parent molecule for novel angiogenesis inhibitors. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 5, 573–579, 2007.

LIMA, T. D.; FERNANDES, O. F. L.; SOUZA, H. L. K.; PASSOS, S. X.; SILVA, M. R. R. *Candida albicans* de mucosa vaginal: morfotipagem e produção de proteinase. *Revista de Patologia Tropical*, Goiania, v. 33, n. 1, p. 65-70, 2004.

LIN, S. C.; MINTON, M. A.; SHARMA, M. M.; GEORGIU, G. Structural and immunological characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF 2. *Appl Environ Microbiol*, v.60, p. 31-38, 1994.

LIN, S. C. Biosurfactans: Recent Advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 66, p. 109-120, 1996.

LISTER, P.D. Carbapenems in the USA: Focus on doripenem. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 5, p. 793–809, 2007.

LIU, X.Y.; YANG, S.Z.; MU, B.Z. Isolation and characterization of a C-12- lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. *Journal of Peptide Science*, v. 14, ed. 7, p. 864-875, 2008.

LIU, J. L., YANG, J., YANG, S., YE, R., MU, B. Effects of different Amino Acids in Culture Media on Surfactin Variants Produced by *Bacillus subtilis* TD7, *Applied Biochemistry and Biotechnologic*, v. 166, n. 8, p. 2091-2100, 2012. In Sousa, J. R. Tese de Doutorado em Produção de lipopeptídeos e glicolípídeos a partir da bioconversão do co-produto da produção de biodiesel. São Paulo, 2012.

LODEWYCKX, C. *et al.* Endophytic Bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, v. 21, p. 583-606, 2002.

LOEFFLER, W.; TSCHEN, S. M.; VANITTANAKOM, N.; KUGLER, M.; KNORPP, E.; HSIEH, T. F.; WU, T. G. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3: a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *Journal of Phytopathology*, v. 115, p. 204-213, 1986.

LOPES, A. A.; GUIMARAES, D. O.; PUPO, M.T. *Ciencia Hoje*, v.286, n.30, 2011.

LUCERO, M. E.; BARROW, J. R.; OSUNA, P.; REYES, I. Plant-fungal interactions in arid and semi-arid ecosystems: Large-scale impacts from microscale processes. *Journal of Arid Environments*, n. 65, p. 276- 284, 2006.

MACCABE, A.; VAN LIEMPT, H.; PALISSA, H.; UNKLES, S.E.; RIACH, M.B.R.; PFEIFER, E.; VON DOHREN, H.; KINGHORN, J.R. Delta- (L-alpha-aminoadipyl) Lcysteinyl- D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. Molecular characterization of the acvA gene encoding the first enzyme of the penicillin biosynthetic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, v.266, p.12646-12654, 1991.

MACHADO, A.; LIRIA, C.L.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, T. Chemical and enzymatic peptide syntheses: basic aspects and applications. *Química Nova*, v.27, p.781-789, 2004.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA J.R. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, n.3, p. 429-438, 2002.

MAGET-DANA, R. et al. Interfacial Properties of the Antifungal Iturins on Various Electrolyte Solutions. *Journal of Colloid and Interfacial Science*, v. 149, n.1, p. 174-183, 1992.

- MALANOSKI, G.J.; COLLINS, L.; WENNERSTEN, C.; MOELLERING, R. JR.; ELIOPOULOS, G. M. *In vitro* activity of biapenem against clinical isolates of Gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 37, p. 2009–2016, 1993.
- MALFANOVA, N.; FRANZIL, L.; LUGTENBERG, B.; CHEBOTAR, V.; ONGENA, M. Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. *Archives of Microbiology*, v. 194, p. 893-899, 2012
- MANN, M.; MENG, C. K.; FENN, J. B. *Analytical Chemistry*, v. 61, p. 1702, 1989.
- MARCON, J. Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de *Citrus* spp. E interação com *Xylella fastidiosa*. São Paulo, 2002. 91p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.
- McCORMACK, P. L.; PERRY, C. M. Caspofungin A: Review of its use in the treatment of fungal infections. *Drugs* v.65, p. 2049–2068, 2005.
- MEN, L. J.; WANG, Y. S. Fragmentation of the desprotonated ions of peptides containing cysteine, cysteine sulfinic acid, cysteine sulfonic acid, aspartic acid, and glutamic acid. *Rapid Communication of Mass Spectrometry*, v.20, p. 777-784, 2009.
- MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: MAIA, L. C.; MALOSSO, E.; YANO-MELO A.M. *Micologia: avanços no conhecimento*. 1ed. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2007. p.129-140.
- MOLINARI, G. Natural products in drug Discovery: Present status and perspectives. *Pharmaceutical Biotechnology- Advances in experimental Medicine and Biology*, v. 655, p. 13-27, 2009.
- MOLNAR, I.; SCHUPP, T.; ONO, M.; ZIRKLE, R.; MILNAMOW, M.; NOWAKTHOMPSON, B.; ENGEL, N.; TOUPET, C.; STRATMANN, A., CYR, D.D., GORLACH, J., MAYO, J.M., HU, A., GOFF, S., SCHMID, J.; LIGON, J.M. The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Chemistry & Biology*, v.7, p.97-109, 2000.
- MOOTZ, H.; MARAHIEL, M.A. Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.1, p.543-551, 1997.
- MOOTZ, H. D.; SCHWARZER, D.; MARAHIEL, M. A. Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, p.5848-5853, 2000.
- MORAIS, J. F., YOSHIMOTO, M., RHODEN, S. A., PAMPHILE, J. A. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. *Revista Uningá*, v. 17, n. 1, p. 27-34, 2014.

MORAN, S.; ROBERTSON, K.; PARADISI, F.; RAI, D. K.; MURPHY, C. D. Production of lipopeptides in *Bacillus sp.* CS93 isolates from Pozol. Federation of European Microbiological Societies, v. 304, p. 69-73, 2010.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide Biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, p. 211-218, 2000.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v 133, p. 183-198, 2005.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Medica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 207, 2000.

MURRAY, P. *et al.* *Microbiologia médica*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 220- 223.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 7, p. 2764-2769, 1996.

NAKANO, M. M.; ZUBER, P. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 10, p. 223-240, 1990.

NAKANO, M.M.; CORBELL N.; BESSON J.; ZUBER P. Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics*, v.232, p.313-321, 1992.

NARUSE, N.; TENMYO, O.; KOBARU, S.; KAMEI, H.; MIYAKI, T.; KONISHI, M.; OKI, T. Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *Journal of Antibiotic*, v. 43, p. 267-280, 1990.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461- 477, 2007.

NISHIKIORI, Y.; NAGANAWA, H.; MURAOKA, Y.; AOYAGI, T.; UMEZAWA, H. Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302 ff67. III. Structural elucidation of plipastatins. *Journal of Antibiotic*, v. 39, p. 755-761, 1986.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M.; *Biossurfactantes: Propriedades e aplicações*. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 772- 776, 2002.

NITSCHKE, M. Produção e caracterização de biosurfatante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. *Dissertação de Mestrado – Campinas, SP.*, 88p. 2004.

NGUYEN, K. T., RITZ, D., GU, J., ALEXANDER, D., CHU, M., MIAO, V., BRIAN, P., BALTZ, R. Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin.

Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 103, n. 46, p. 17462-17467, 2006.

NORIYASU, I., SHAHEDUR, R. M., TAKASHI, A. Production of iturin A homologues under different culture conditions. *Journal of Environmental Sciences*, p. 28-32, 2009.

OHNO, A., ANO, T., SHODA, M. Effect of Temperature on Production of Lipopeptides Antibiotics, Iturin A and Surfactant by a Dual Producer, *Bacillus subtilis* RB14, in Solid State Fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 80, n. 5, p. 517-519, 1995.

OKI, Y.; FERNANDES, G. W.; CORREA JUNIOR, A. Fungos: amigos ou inimigos? *Ciência Hoje*, v. 42, n. 252, p. 64-66, 2008.

OLIVEIRA, J. M.; CRUZ, A. S.; FONSECA, A. F.; VAZ, C. P.; RODRIGUES, A.; AUREA, F. Prevalence of *Candida albicans* in vaginal fluid of asymptomatic Portuguese women. *The Journal of Reproductive Medicine*, Chicago, v. 38, n. 1, p. 41-42, 1993.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, v. 9, ed. 4, p. 1084-1090, 2007.

ORLICEK, M. D.; SHARI, L. Aztreonam. *Seminars in pediatric infectious diseases. Antimicrobial Therapy, Part-2*, v. 10, p. 45-50, 1999

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, v. 276, p. 734-740, 1997.

PAMPHILE, J. A.; ROCHA, C. L. M. S. C.; AZEVEDO, J. L. Co-transformation of a tropical maize endophytic isolate of *Fusarium verticillioides* (synonym *F. moniliforme*) with *gusA* and *nia* genes. *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, n. 2, p. 253-258, 2004.

PARK, S.Y.; KIM, Y. Surfactin inhibits immunostimulatory function of macrophages through blocking NK $\kappa$ B, MAPK and Akt pathway. *International Immunopharmacology*, v. 9, p. 886 - 893, 2009.

PATHAK, K. V.; KEHARIA, H.; GUPTA, K.; THAKUR, S.S.; BALARAM, P. Lipopeptides from the Banyan endophyte, *Bacillus subtilis* K1: Mass Spectrometric characterization of a library of fengycins. *Journal American Society for Mass Spectrometry*, v. 23, p. 1716-1728, 2012.

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

PERFUMO, A.; SMYTH, T. J. P.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates. K. N. Timmis (ed.). *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v. 09, p. 1502-1510, 2010.



- PETERS, A. F. Field and culture studies of *Streblonema macrocystis* sp. nov. (Ectocarpales, Phaeophyceae) from Chile, a sexual endophyte of giant kelp. *Phycologia*, v. 30, p. 365-377, 1991.
- PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Eds.). *Microbial ecology of leaves*. New York: Springer Verlag, p. 179-197, 1991.
- PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Controlle biosynthesis of Val7- and Leu7-surfactins. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 36, p. 515-517, 1992.
- PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; LABBEA, H.; GRANGEMARD, I.; DAS, B. C.; PTAK, M.; WALLACH, J.; MICHEL, G. [Ala4]surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. *European Journal of Biochemistry*, v. 224, p. 89-96, 1994.
- PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 51, p. 553-63, 1999.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Review*; Iowa, v. 20 p. 133-163, 2007.
- PIMENTEL, M. R.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A. P.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. *Biotechnology Research International*, 11p, 2011.
- PROKOF'ETA, N. G.; KALINOVSKAYA, N. I.; LUK'YANOV, P. A.; SHENTSOVA, E. B.; KUZNETSOVA, T. A. The membranotropic activity of cyclic acyldepsipeptides from bacterium *Bacillus pumilus*, associated with the marine sponge *Ircinia* sp. *Toxicon*, v. 37, p. 801-813, 1999.
- PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. Microbial natural products: A promising source of bioactive compounds. In: *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*. Research Signpost. Editor: Carlton A. Taft, p. 197 In: *Microbial natural products: A promising source of bioactive compounds*. Ed. Research, Kerala, India, p. 51-78, 2006.
- RAJA, A. LABONTE, J.; LEBBOS, J.; KIRKPATRICK, P. Daptomycin. *Nature Review Drug Discovery*, v. 2, p. 943-944, 2003.
- RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; HBID, C.; JACQUES, P.; DESTAIN, J.; THONART, P. Purification of antifungal lipopeptides by reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 639, p.81-85, 1993.
- RETSCH-BOGART, G. Z.; QUITTNER, A. L.; GIBSON, R. L.; OERMANN, C. M.; McCOY, K.S.; MONTGOMERY, A. B.; COOPER, P. J. Efficacy and safety of inhaled aztreonam lysine for airway *Pseudomonas* in cystic fibrosis. *Chest*, v. 135, p. 1223-1232, 2009.

RODRIGUES, D. P.; THEOPHILO, G. N. D.; REIS, E. M. F.; LAZARO, N. S. Doencas de Transmissao Alimentar: Aspectos Clinicos, Coleta e Transporte de Material. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Lab. Ref. Nacional Colera e outras Enteroinfecções. Man. Lab. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 2008. 27p.

ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J.; J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, v. 11, p. 601, 1984.

ROMERO, D.; VICENTE, A.; OLMOS, J.L.; DÁVILA, J.C.; PÉREZ-GARCÍA, A. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 969-976, 2007.

ROSE, W.; RYBAK, M. Tigecycline: First of a new class of antimicrobial agents. *Pharmacotherapy*, v. 26, p. 1099–1110, 2006

ROTH, K. D. W.; HUANG, Z. H.; SADAGOPAN, N.; WATSON, J. T. Charge derivatization of peptides for analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, v.17, p. 255-274, 1998.

ROZSAK, D. B., COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiology Review*, v. 51, p. 365-379, 1987.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, 2007.

SANTOS, C. C.; OLIVEIRA, F. A.; SANTOS, M. S.; TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; SANTOS, F. J. Influência de *Trichoderma* spp. Sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*. *Scientia plena*, v.8, p. 1-5, 2012.

SCHIMEL, J. Ecosystem consequences of microbial diversity and community structure. *Ecological Studies*, v. 113, p. 239-254, 1995.

SCHNEIDER, J.; TARAZ, K.; BUDZIKIEWICZ, H.; DELEU, M.; THONART, P.; JACQUES, P. The structure of two fengycins from *Bacillus subtilis* S499. *Zeitschrift Naturforschung C*, v. 54, p. 859-865, 1999.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. *Mycological Research Cambridge*, v. 109, p. 661- 686, 2005.

SEYDLOVA, G., SVOBODOVA, J. Review of surfactina chemical properties and the potential biomedical application. *Central European Journal of Medicine*, v. 3, p. 123-133, 2008.

SHAD, P. M.; ISSACA, R. D. Ertapenem, the first of a new group of carbapenem. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, p. 538–542, 2003.

SHIOMI, H. F.; SILVA, H. S. A.; MELO, I. S.; NUNES, F. V.; BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 63, n. 1, p. 32-39, 2006.

SILVA, J. R. C.; SOUZA, R. M.; ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P.; CASTRO, A. M. S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. *Ciência e agrotecnologia*, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, 2008.

SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER, M.B.; KRUEGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ R.C. Métodos de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos. Itajaí: Ed Univali; 2003, p. 239.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isoladas de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*, v. 34, p. 185-195, 2004.

SONG, Y., TALATY, N., DATSENKO, K., WANNER, B.L., COOKS, R.G. In vivo recognition of *Bacillus subtilis* by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). *Analyst*, v.134, p.838-841, 2009.

SPRENT, J. I.; FARIA, S. M. Mechanismos of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant and soil*, Dordrecht, v. 110, p. 157-165, 1988.

STIERLE, A., STROBEL, G. A., STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, v. 260, p. 214-216, 1993.

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: BACON, C. W.; WHITE, J. F. (Eds.). *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker, p. 3-30, 2000.

STRAUS, S. K.; HANCOCK, R. E. W. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1758, p. 1215-1223, 2006.

STROBEL G. A.; DAISY B. H.; CASTILLO U.; HARPER J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, v. 5, p. 535-544, 2003.

STROBEL, G. A.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D.; FUNG, P. C. W.; CHAN, K. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*, v. 60, p.179-183, 2002.

- STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Review*, v. 67, p. 491-502, 2003.
- STROBEL, G. A.; ZIN, N. M.; SARMIN, N. I. M.; GGANDHI, N.; BARSÍ, D. F.; SIDIK, N. M.; HESS, M. Bioactive endophytic streptomycetes from the Malaya Peninsula. *FEMS Microbiology Letters*, v. 274, p. 83-88, 2007.
- STURZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant and Soil*, v. 15, p. 257-263, 1995.
- STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biological and fertilizer soils*, v. 25, p. 13-19, 1997.
- STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable system of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 19, p. 1-30, 2000.
- TALLY, F. P.; DEBRUIN, M. F. Development of daptomycin for Gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 46, p. 523-526, 2000.
- TAYLOR, T. N.; TAYLOR, E. L. The rhynie chert ecosystem: a model for understanding fungal interactions. In: BACON, C. W.; WHITE JR., J. F. (Eds.). *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker Inc., 2000.
- TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R.R. *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R. *et al.* (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 8. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 422-33, 2003.
- THASANA, N.; PRAPAGDEE, B.; RANGKADILOK, N.; SALLABHAN, R.; AYE, S. L.; RUCHIRAWAT, S.; LOPRASERT, S. *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtilin A, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated  $\beta$ -amino acid. *Federation of European Biochemical Societies*, v.584, p. 3209-3214, 2010.
- THIMON, L.; PEYPOUX, F.; DANA-MAGET, R.; MICHEL, G. Surface-active properties on antifungal lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 69, p. 92-93, 1992.
- THOMAS, D. W.; ITO, T. The revised structure of the peptide antibiotic esperin, established by mass spectrometry. *Tetrahedron*, v. 25, p. 1985-1990, 1969.
- TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, n. 8, p. 508-513, 2002.
- ULLRICH, C.; KLUGE, B. PALACZ, Z.; VATER, J. Cell-Free Biosynthesis of Surfactin, a cyclic Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, v. 30, p. 6503-6508, 1991.
- URIZAR, N. L.; LIVERMAN, A. B.; DODDS, D. T.; SILVA, F. V.; ORDENTLICH, P.; YAN, Y.; GONZALES, F. J.; HEYMAN, R. A.; MANGELSDORF, D. J.; MOORE, D.

D. A natural products that lowers cholesterol as na antagonista ligant for FxR. *Science*, v. 296, p. 1703- 1706, 2002.

VAL, I. C. C.; ALMEIDA FILHO, G. L. Abordagem atual da candidíase vulvovaginal. *DST Jornal Brasileiro das Doenças Sexualmente Transmissíveis*, Niterói, v. 13, n. 4, p. 3-5, 2001.

VAN WAGENINGEN, A.M.; KIRKPATRICK, P.N.; WILLIAMS, D.H.; HARRIS, B.R.; KERSHAW, J.K.; LENNARD, N.J.; JONES, M.; JONES, S.J.; SOLENBERG, P. Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *The Journal of Biological Chemistry*, v.5, p.155-162, 1998.

VANITTANAKOM, N.; LOEFFLER, W.; KOCH, U.; JUNG, G. Fengycin – A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *Journal of Antibiotics*, v. 39, ed. 7, p. 888-901, 1986.

VASS, E.; BESSON, F.; MAJER, Z.; VOLPON, L.; HOLLÓSI, M. Ca<sup>2+</sup> - Induced changes of Surfactin conformation: A FTIR and circular dichroism study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 282, p. 361-367, 2001.

VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S.S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 12, p. 6210-6219, 2002.

VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. Anidulafungin: A novel echinocandin. *Clinical Infectious Diseases*, v. 43, p. 215–222. 2006.

WEBER, G., SCHORGENDORFER, K., SCHENEIDER-SCHERZER, E., LEITNER, E. The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Current Genetics*, v.26, p.120-125, 1994.

WELLINGTON, K.; NOBLE, S. Telithromycin. *Drugs*, v. 64, p. 1683–1694, 2004.

WILLIAMS, D. W.; POTTS, A. J.; WILSON, M. J.; MATTHEWS, J. B.; LEWIS, M. A. Characterisation of the inflammatory cell infiltrate in chronic hyperplastic candidosis of the oral mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medical*, Singapore, v. 26, n. 2, p. 83-89, 1997.

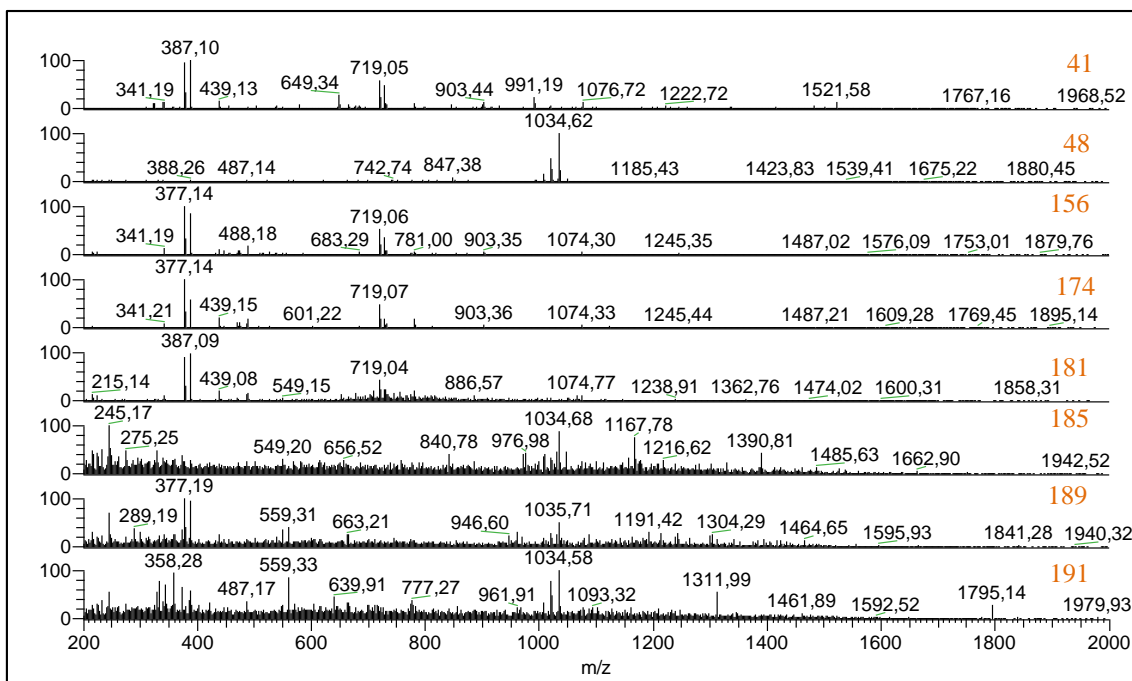
WOO, S.; GARDNER, E.R.; CHEN, X.; OCKERS, S. B.; BAUM, C. E.; SISSUNG, T. M.; PRICE, D. K.; FRYE, R.; PIEKARZ, R. L.; BATES, S. E.; FIGG, W. D. Population pharmacokinetics of romidepsin in patients with cutaneous T-cell lymphoma and relapsed peripheral T-cell lymphoma. *Clinical Cancer Research*, v. 15, p. 1496–1503, 2009.

YANG, S.; WEI, D.; UM, B. Determination of the amino acid sequence in a cyclic lipopeptide using MS with DHT mechanism. *Journal of Biochemical and Biophysical*, v. 68, p. 69-74, 2006.

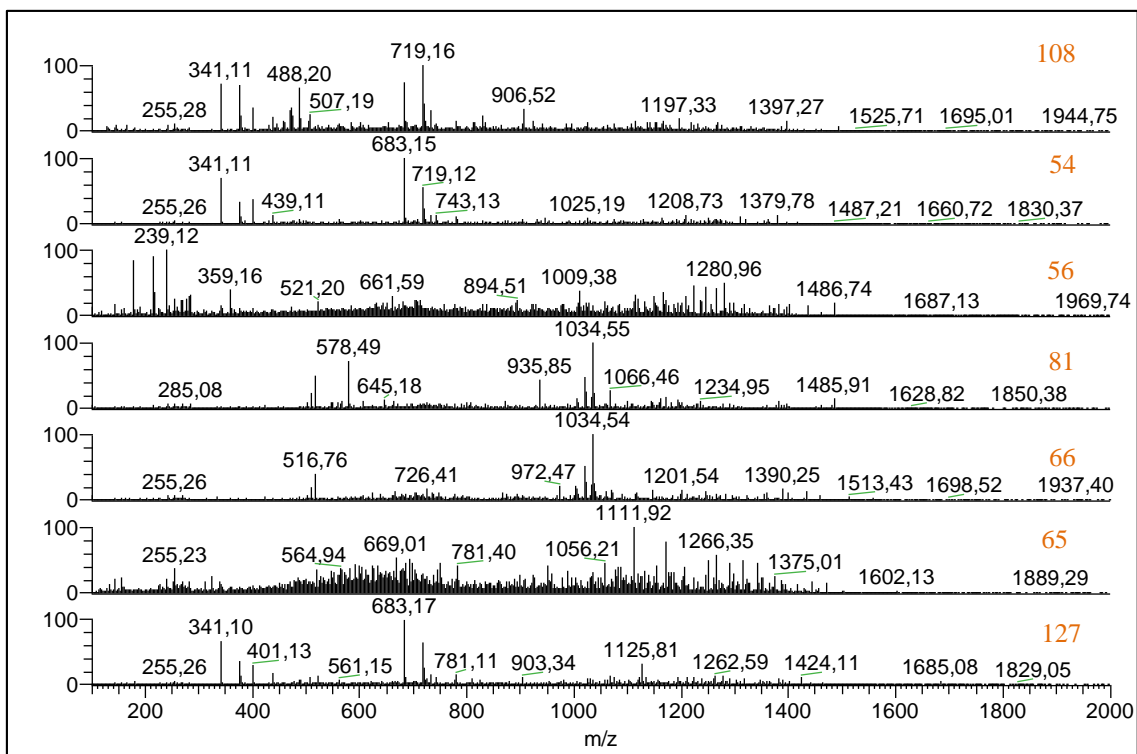
YUAN, B.; WANG, Z.; QIN, S.; ZHAO, G.; FENG, Y.; WEI, LI.; JIANG, J. Study of the anti-sapstain fungus activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CGMCC 5569 associated with Ginkgo Biloba and identification of its active componentes. *Bioresource Technology*, v. 114, p. 536-541, 2012.

ZHANG, X.; LI, B.; WANG, Y.; GUO, Q. Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agente *Bacillus atrophaeus* CAB-1. *Applied Microbial and Cell Physiology*, v. 97, p. 9525-9534, 2013.

# APÊNDICES



**Figura 37.** Espectros de ESI-ITMS no modo negativo das linhas 41, 48, 156, 174, 181, 185, 189 e 191.



**Figura 38.** Espectros de ESI-ITMS no modo negativo das linhas 108, 54, 56, 81, 66, 65 e 127.



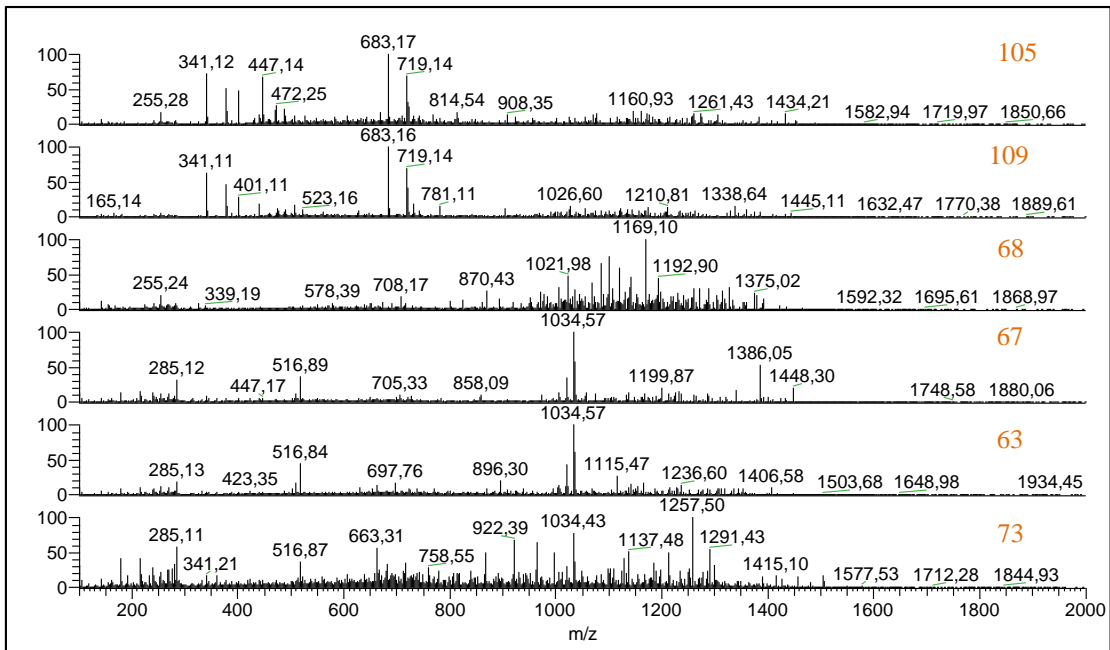


Figura 39. Espectros de ESI-ITMS no modo negativo das linhagens 105, 109, 68, 67, 63 e 73.

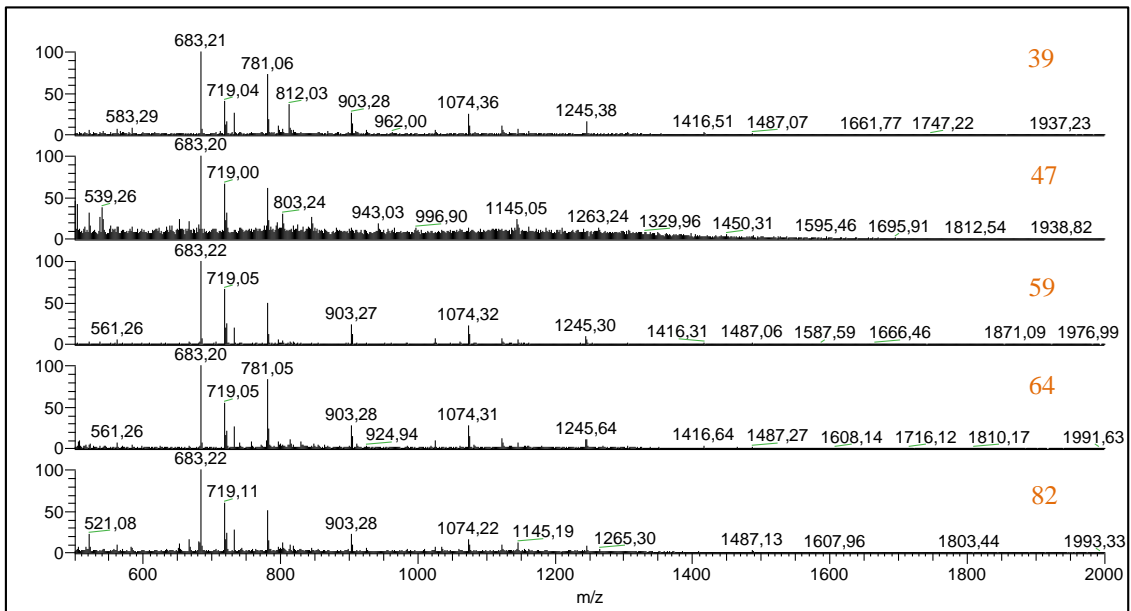


Figura 40. Espectros de ESI-ITMS no modo negativo das linhagens 39, 47, 59, 64, e 82.

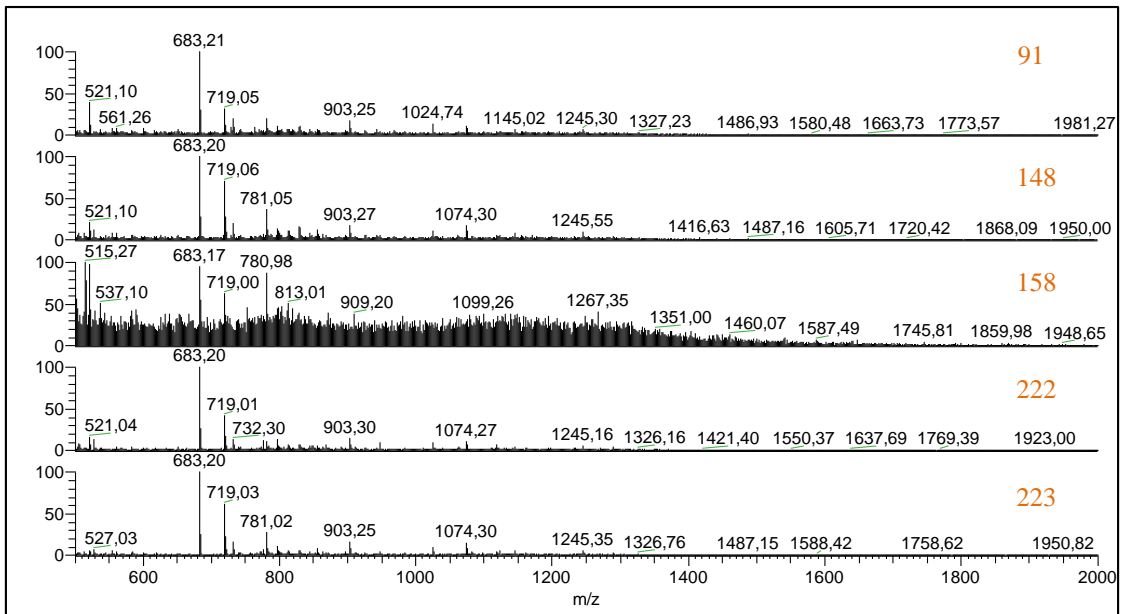


Figura 41. Espectros de ESI-ITMS no modo negativo das linhas 91, 148, 158, 222 e 223.

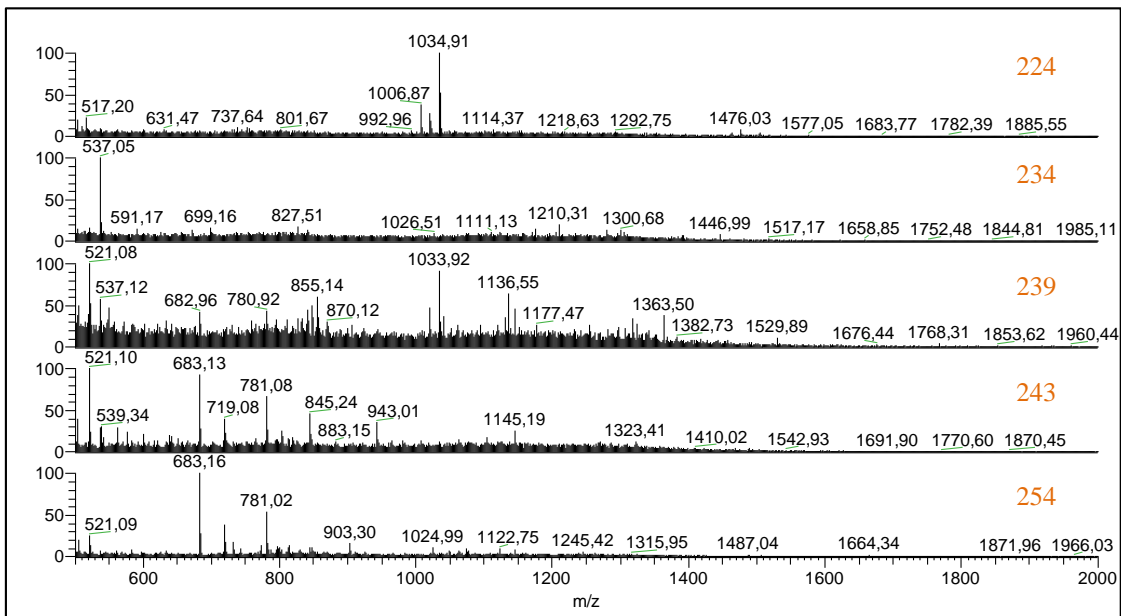
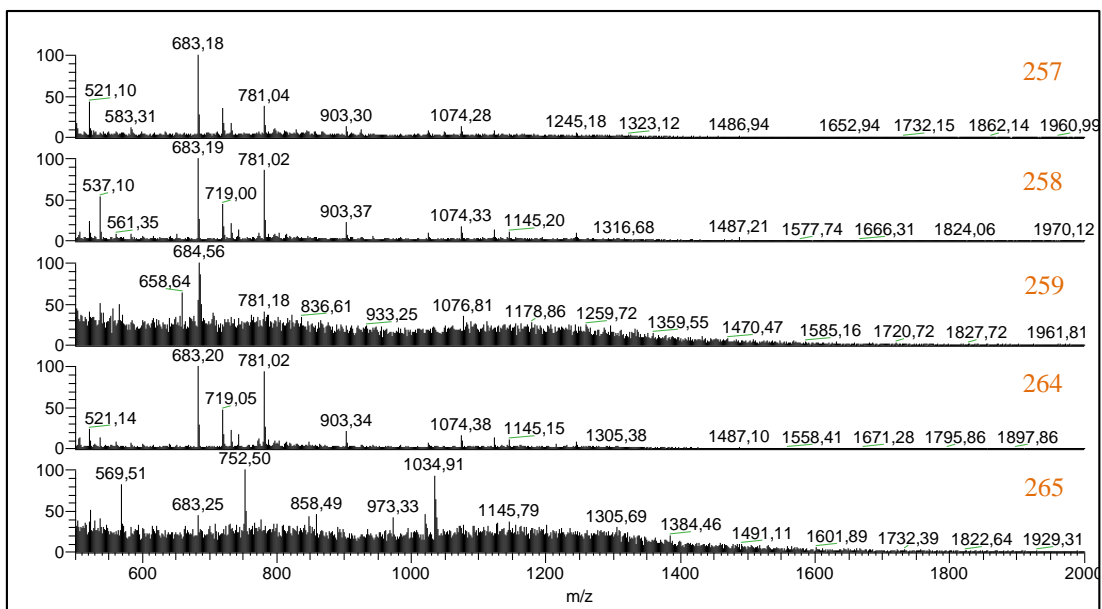
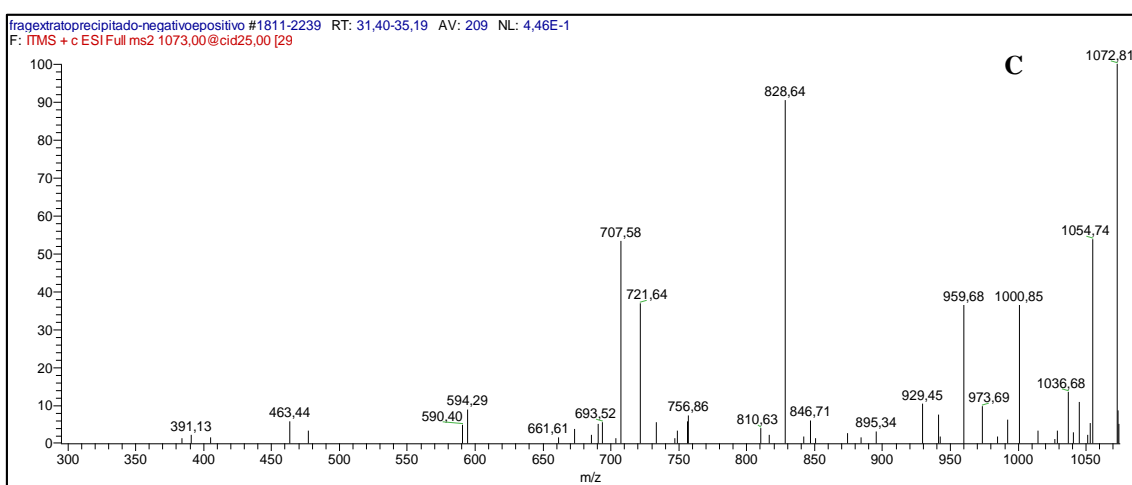
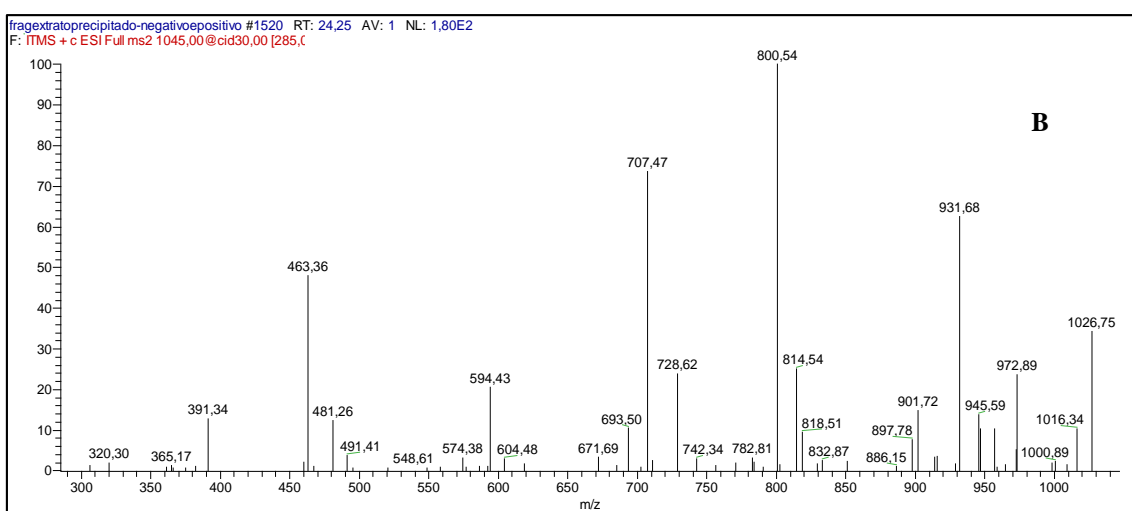
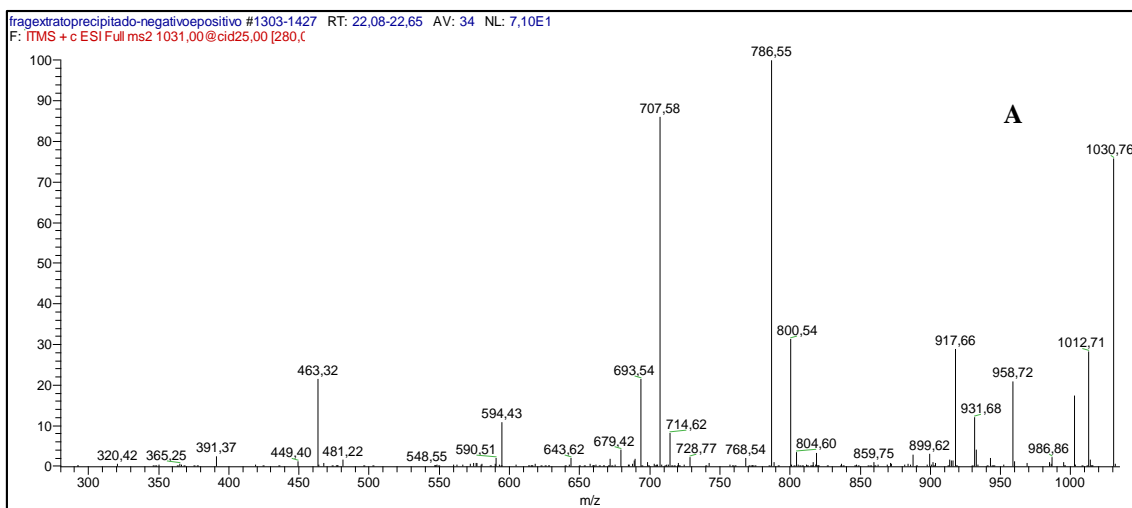


Figura 42. Espectros de ESI-ITMS no modo negativo das linhas 224, 234, 239, 243 e 254.

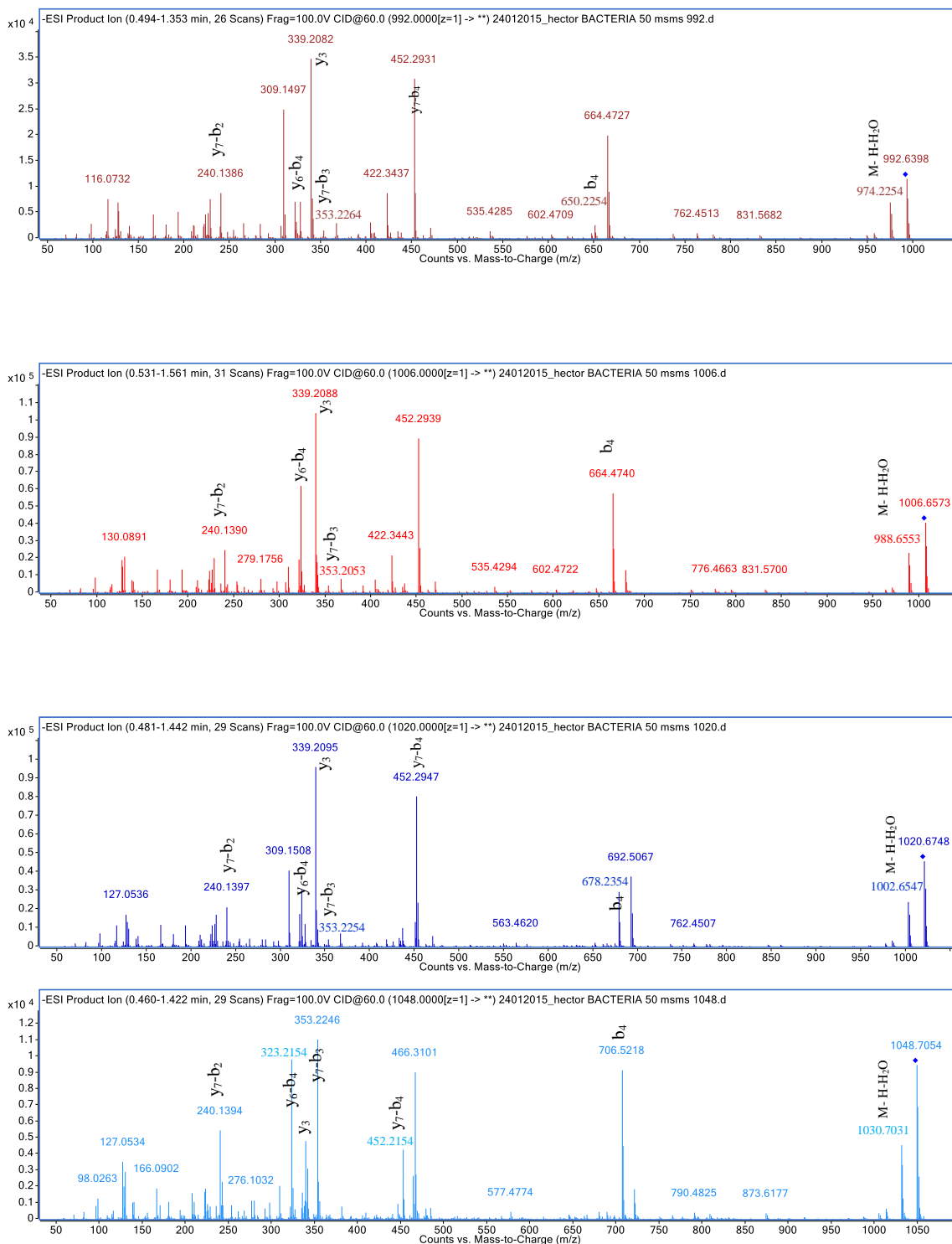


**Figura 43.** Espectros de ESI-ITMS no modo negativo das linhas 257, 258, 259, 264 e 265.



**Figura 44.** Espectros de ESI-ITMS<sup>2</sup> dos íons fragmentos de sódio [M+Na]<sup>+</sup> (A) *m/z* 1030, (B) 1044 e (C) 1072, presentes no extrato LP76.

MS/MS



**Figura 45.** Espectros de fragmentação ESI – MS<sup>2</sup> no modo negativo dos íons de  $m/z$  992, 1006, 1020, 1034 e 1048 presentes no extrato LP 50.