

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

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS BIOATIVOS
PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE PLANTAS DA
REGIÃO AMAZÔNICA**

ADRIANA SPIROTTA STEIN MESQUITA

MANAUS/AM

2020

ADRIANA SPIROTTA STEIN MESQUITA

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS BIOATIVOS
PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE PLANTAS DA
REGIÃO AMAZÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química, linha de pesquisa Produtos Naturais.

ORIENTADOR: DR. AFONSO DUARTE LEÃO DE SOUZA
CO-ORIENTADORA: DR.^a ANTONIA QUEIROZ LIMA DE SOUZA (FCA/UFAM)

MANAUS/AM

2020

Ficha Catalográfica

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

M582p Mesquita, Adriana Spirotto Stein
Produção e purificação de lipopeptídeos produzidos por bactérias endofíticas de plantas da região Amazônica / Adriana Spirotto Stein
Mesquita . 2020
269 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Afonso Duarte Leão de Souza
Coorientadora: Antonia Queiroz Lima de Souza
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Lipopeptídeos. 2. Bactérias endofíticas. 3. Espectrometria de massas. 4. *B. amyloliquefaciens*. I. Souza, Afonso Duarte Leão de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE PLANTAS DA REGIÃO AMAZÔNICA

ADRIANA SPIROTTA STEIN MESQUITA

Tese de Doutorado 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 Doutora em Química.

Aprovada em 15 de setembro de 2020.



Dr. Afonso Duarte Leão de Souza (DQ/UFAM)

Presidente/Orientador



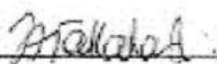
Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro (UFAM)

Membro Interno



Dr. João Vicente Braga de Souza (INPA)

Membro Externo



Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi (UFMG)

Membro Externo



Dr. Carromberth Carioca Fernandes (UFAC)

Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas

Manaus, 15 de setembro de 2020.

DEDICO ESTE TRABALHO...

“A Deus pela sabedoria e força nesta jornada;

Aos meus queridos pais biológicos José Antônio e Luzia por TODO esforço e dedicação para me proporcionar uma boa educação e por serem tão especiais em minha vida;

Aos meus pais adotivos Sergio e Risoleide por todo apoio para que eu pudesse realizar este sonho e por serem tão queridos em minha vida;

À meu amado esposo Denny que sempre esteve do meu lado com todo amor, carinho e paciência;

Aos filhos Giuseppe, Giovanni e Giuliano que tanto amo, pelas orações e por alegrarem minha vida;

À meu irmão Natalino e sua esposa Zenilda, e sobrinho tão queridos, KhaiKy, Kainan, Larissa e Guilherme. Ao irmão Junior e sua esposa Roselena e aos lindos sobrinhos, Henrique e Gabriel;

Aos queridos cunhados Lindsay e Diogo, Sergio Junior e Karla, Erick Rodrigo e aos sobrinhos Yoseph, Hadassa e Henry muito obrigada por tudo e pelos momentos de alegria;

Aos tios Aroldo e Rizely, Sergio e Vanda, Risenilde e Teófanés, e primos Ryzivan Gabriela, Oliver, Alexandre, Dayane, Isac, obrigada por todo apoio e pelas alegrias;

A querida amiga Regina, pelo apoio com os filhotes durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, pela dádiva da vida, pelas pessoas tão especiais que colocou em meu caminho que contribuíram muito para que eu chegasse até aqui, pela possibilidade de realizar um trabalho tão satisfatório, e por me auxiliar nos momentos de dificuldade e aflição.

Ao meu orientador Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, pela amizade e por todos os ensinamentos compartilhados ao longo desses anos, obrigada pela paciência e compreensão em tantos momentos quando precisei.

À minha Co-orientadora Dr^a. Antonia Queiroz Lima de Souza, pela amizade, dedicação e alegria em ensinar, por me guiar pelo fantástico mundo dos microrganismos, obrigada pela paciência e compreensão em tantos momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida, imprescindível no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela oportunidade de aprimoramento que oferece aos profissionais de Química através dos Programa de Pós-Graduação em Química, no qual também tive a oportunidade de realizar o meu mestrado.

Aos professores do curso de Pós-Graduação pela dedicação e pelos valiosos ensinamentos, em especial ao Dr. Jefferson Rocha, Dr. Marcos Machado, Dr. Afonso Duarte, Dr^a Rita Saraiva e Dr^a Vanusa Oliveira, pelos conhecimentos repassados e paciência durante as disciplinas cursadas.

Aos professores Dr. Hector, Dr. Sergio e Dr. Emerson, pelas colaborações e esclarecimentos durante o exame de qualificação.

À Central analítica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela oportunidade de execução deste trabalho.

À minha amiga Dr^a Lorena pela amizade de longas datas e pelo incentivo em todo tempo.

À equipe do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LabMICRA), Sara, Paulo, Rachid, Marta, Ketlen, Francisca, Edinaldo, Gabriel, Kamila, muito obrigada pela amizade, auxílio, ensinamentos e pelos muitos momentos de alegria, com certeza vocês já fazem parte da minha vida na pesquisa.

Ao secretário da Pós-Graduação Bruno, pela amizade e pelo grande trabalho desenvolvido na secretaria.

À Central analítica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela realização das análises de Espectrometria de Massas de alta resolução.

À Divisão de Biotecnologia, Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas pelo auxílio na realização da identificação das bactérias endofíticas deste trabalho e pelo uso de equipamentos.

Ao Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia - (DCDIA) do Instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane (ILMD) FIOCRUZ-Amazonas pela realização dos ensaios de atividade antibacteriana e antimaláricos.

Aos amigos do Laboratório de Espectrometria de Massas, Richardson Almeida, Bruna Ribeiro, Elzalina Soares e Felipe Moura pelo auxílio, ensinamentos e pelos momentos de alegria.

Aos amigos Magno, Zelina, Kidney e Edinilze pelos ensinamentos e realização de análises.

Mais uma vez, à meu querido esposo Denny Mesquita pelo apoio, paciência, amor e pelos lindos presentes que me deu, nossos queridos filhos Giuseppe, Giovanni e Giuliano, e também pela amizade e companheirismo como colega de Pós-Graduação.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

“ Confie no Senhor de todo coração e não se apoie na sua própria inteligência. Lembrem de Deus em tudo o que fizer, e Ele lhe mostrará o caminho certo. ”

RESUMO

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DA REGIÃO AMAZÔNICA: O

gênero *Bacillus* possui uma grande variedade de espécies produtoras de metabólitos secundários bioativos com grande potencial em diferentes campos, entre estes os lipopeptídeos, que são compostos anfifílicos com atividades antifúngica, antibiótica e surfactantes. No presente trabalho foram utilizadas três linhagens de bactérias endofíticas de plantas da Amazonia produtoras de lipopeptídeos, identificadas por sequenciamento de 16S rDNA como *B. amyloliquefaciens*. Os dados de espectrometria de massas dos extratos das três linhagens analisadas indicaram a presença dos lipopeptídeos iturina, surfactina e fengicina. Na avaliação do rendimento na produção de lipopeptídeos a partir de diferentes meios de cultivo, o YM apresentou os melhores resultados, tendo a linhagem de *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b o maior rendimento com 633,1 mg. L⁻¹. A otimização da produção de lipopeptídeos para as linhagens de *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b, GhcC1 2.1a e DgcR2 1.1b por planejamento fatorial fracionado 2⁴⁻¹ e dados obtidos da ANOVA permitiram propor um modelo eficaz obtendo um aumento significativo da produção de lipopeptídeos a partir de variações de pH, agitação e aeração. A partir das análises de LC-ESI-MS/MS e RMN dos isolados de PpC1 2.2b foram identificadas dezessete substâncias lipopeptídicas incluindo seis homólogos da iturina A, sete homólogos da surfactina A, dois homólogos da fengicina A e dois da fengicina B. As frações de surfactinas, iturinas e fengicinas apresentaram atividades anti-inflamatórias por inibição da produção de NO em células de macrófagos murinos J774A.1 com viabilidade celular acima de 100%. As amostras LP196, Fengicina AB1 e Iturina A2 apresentaram atividade antiplasmódica contra *P. falciparum* FCR3, exibindo CI₅₀ de, 58,52 µg mL⁻¹, 58,0 µg.mL⁻¹ e 66,83 µg.mL⁻¹ e o extrato LP164 apresentou atividade antibacterina contra *K. pneumoniae* com MIC de 62,5 µg.mL⁻¹.

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

ABSTRACT

PRODUCTION AND PURIFICATION OF BIOACTIVE LIPOPEPTIDES PRODUCED BY ENDOPHYTIC BACTERIA FROM THE AMAZON REGION:

The *Bacillus* genus has a wide variety of species that produce bioactive secondary metabolites with great potential in different fields, including lipopeptides, which are amphiphilic compounds with antifungal, antibiotic and surfactant activities. In the present work, three strains of endophytic bacteria from Amazonian plants producing lipopeptides used, identified by sequencing 16S rDNA as *B. amyloliquefaciens*. The mass spectrometry data of the extracts of the three strains analyzed indicated the presence of the lipopeptides iturin, surfactin and fengycin. In the evaluation of the yield in the production of lipopeptides from different culture media, YM presented the best results, with the *B. amyloliquefaciens* PpC12.2b strain having the highest yield, 633.1 mg. L⁻¹. The optimization of lipopeptide production for *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b, GhcC1 2.1a and DgcR2 1.1b lines by fractional factorial planning 2⁴⁻¹ and data obtained from ANOVA allowed us to propose an effective model for increasing lipopeptide production from pH variations, agitation and aeration. From the LC-ESI-MS / MS and NMR analyzes of the PpC12.2b isolates, seventeen lipopeptide substances were identified, including six iturin A homologues, seven surfactin A homologues, two fengycin A homologues and two fengycin B. Fractions of surfactins, iturins and fengycin showed anti-inflammatory activities by inhibiting the production of NO in cells of murine macrophages J774A.1 with cell viability above 100%. Samples LP196, Fengycin AB1 and Iturin A2 showed antiplasmodic activity against *P. falciparum* FCR3, exhibiting IC₅₀ of 58.0 µg.mL⁻¹, 58.52 µg.mL⁻¹ and 66.83 µg.mL⁻¹ and the LP164 extract showed activity antibacterine against *K. pneumoniae* with MIC of 62.5 µg.mL⁻¹.

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

LISTA DE ABREVIações

Φ - largura da coluna cromatográfica
APCI- Atmospheric Pressure Chemical Ionization
CI50 - Concentração inibitória de 50% do crescimento da população (células ou microrganismos)
CIM - Concentração Inibitória Mínima
COSY - Correlation spectroscopy
DAD - Diode Array Detection
DCM- Diclorometano
ESI-MS – Modo de ionização por elétron-spray de Espectrometria de massas.
HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence
J - constante de acoplamento
LC- Liquid Chromatography
m - multiplete
m/z - razão massa carga
 M^+ - íon molecular
MS - Mass Spectrometry
MS-MS- Tandem Mass Spectrometry
NOE- Nuclear Overhauser Effect
NOESY- Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NIST- National Institute of Standards and Technology
ROESY- Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
s- simpleto
sl- simpleto largo
SPE – Solid Phase Extraction
TOCSY- Total Correlated Spectroscopy
tr - tempo de retenção
t – tripleto
YM – Yeast Malt

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxol.....	33
Figura 2. Metabólitos produzidos por espécies de <i>Bacillus</i>	42
Figura 3. Exemplificação da biossíntese do lipopeptídeo surfactina por NRPSs.	44
Figura 4. Cultura de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> e imagem ampliada de suas estruturas reprodutivas.....	45
Figura 5. Lipopeptídeo Daptomicina produzido por <i>Streptomyces roseoporous</i>	47
Figura 6. Principais lipopeptídeos produzidos por espécies de <i>Pseudomonas</i> . 48	
Figura 7. Lipopeptídeos produzidos por espécies de <i>Bacillus</i>	52
Figura 8. Lipopeptídeos da família da surfactina.....	56
Figura 9. Lipopeptídeos da família da Iturina.....	61
Figura 10. Lipopeptídeos da família da fengicina.	65
Figura 11. Cromatografia do extrato LP164 em sílica C18-E.	76
Figura 12. Fluxograma do fracionamento por SPE do extrato LP164 em escala analítica.....	76
Figura 13. Visualização macro e micro-morfológica das colônias de bactérias endofíticas (a) GhcC1 2.1a, (b) PpC1 2.2b e (c) DgcR2 1.1b.	88
Figura 14. Visualização do padrão eletroforético da extração do DNA genômico das bactérias endofíticas GhcC1 2.1a, PpC1 2.2b e DgcR2 1.1b.....	89
Figura 15. Visualização do padrão eletroforético da amplificação da região do gene 16S rDNA das bactérias endofíticas GhcC1 2.1a, PpC1 2.2b e DgcR2 1.1b.	89
Figura 16. Produção de lipopeptídeos nos diferentes meios de cultivo (YM, ISP2, LANDY e NB) das linhagens de <i>B. amyloliquefaciens</i> GhcC1 2.1a, <i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b e <i>B. amyloliquefaciens</i> DgcR2 1.1b.	91
Figura 17. Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para <i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b (LP164).	94

Figura 18. Gráficos dos valores de médias quadráticas (a) teste F para MSReg e MSres (b), teste F para MSLoF e MSPE (c) e variação explicada (R2) e (d) explicável (R2max) para <i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b (LP164).	98
Figura 19. Gráfico dos valores experimental versus previsto (a), previsto versus resíduo e histograma dos resíduos (b) e coeficiente de regressão (c) para <i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b (LP164).	100
Figura 20. Gráfico dos coeficientes de regressão recalculados para <i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b (LP164).	101
Figura 21. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para o modelo gerado para <i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b (LP164).....	103
Figura 22. Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para <i>B. amyloliquefaciens</i> GhcC1 2.1a (LP50).....	105
Figura 23. Gráficos dos valores de médias quadráticas (a) teste F para MSReg e MSres (b), teste F para MSLoF e MSPE (c) e variação explicada (R2) e explicável (R2max) (d) para <i>B. amyloliquefaciens</i> GhcC1 2.1a (LP50).....	108
Figura 24. Gráfico dos valores experimental versus previsto (a), previsto versus resíduo e histograma dos resíduos (b) e coeficiente de regressão (c) para <i>B. amyloliquefaciens</i> GhcC1 2.1a (LP50).....	110
Figura 25. Gráfico dos coeficientes de regressão recalculados para <i>B. amyloliquefaciens</i> GhcC1 2.1a (LP50).....	111
Figura 26. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para o modelo gerado para <i>B. amyloliquefaciens</i> GhcC1 2.1a (LP50).	112
Figura 27. Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para <i>B. amyloliquefaciens</i> DgcR2 1.1b (LP196).....	114
Figura 28. Gráficos dos valores de médias quadráticas (a) teste F para MSReg e MSres (b), teste F para MSLoF e MSPE (c) e variação explicada (R2) e explicável (R2max) (d) para <i>B. amyloliquefaciens</i> DgcR2 1.1b (LP196).	117
Figura 29. Gráfico dos valores experimental versus previsto (a), previsto versus resíduo e histograma dos resíduos (b) e coeficiente de regressão (c) para <i>B. amyloliquefaciens</i> DgcR2 1.1b (LP196).	119
Figura 30. Gráfico dos coeficientes de regressão recalculados para <i>B. amyloliquefaciens</i> DgcR2 1.1b (LP196).	120

Figura 31. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para o modelo gerado para <i>B. amyloliquefaciens</i> DgcR2 1.1b (LP196).....	121
Figura 32. Espectro de íons totais dos extratos lipopeptídicos das bactérias endofíticas: (a) <i>B. amyloliquefaciens</i> GhcC1 2.1a (LP50), (b) <i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b (LP164) e (c) <i>B. amyloliquefaciens</i> DgcR2 1.1b (LP196).	125
Figura 33. Cromatogramas obtidos por HPLC em fase-reversa, modo TIC positivo. Frações do extrato LP164 de <i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b: (a) BaP-11 (b) BaP-24 (c) BaP-18.....	127
Figura 34. Espectros de LC-APCI-MS dos íons ($[M+H]^+$) de: (a) iturinas (b) surfactinas e (c) fengicinas.	129
Figura 35. Espectro obtido por LC-ESI-MS/MS e proposta de fragmentação da amostra Surfactina A2 de <i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b (LP164).....	132
Figura 36. Ampliações do espectro de RMN de 1H da amostra Surfactina A2 em DMSO – d_6 (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos, c) hidrogênios metilênicos e metílicos.	134
Figura 37. Ampliações do espectro de RMN de 1H da amostra Surfactina A2 em DMSO – d_6 (500 MHz): região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH_2 , β e γ). 135	
Figura 38. Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C da amostra Surfactina A2 em DMSO – d_6 (125 MHz): a) região dos carbonos carbonílicos, b) carbonos α -metínicos e β -metilênicos, c) carbonos metilênicos d) carbonos metilênicos e metílicos.	136
Figura 39. Ampliações do DEPT-135 em DMSO- d_6 (125 MHz) de Surfactina A2 nas regiões: (a) Carbonos metílicos (b) Carbonos metínicos e metilênicos.	137
Figura 40. Correlações homonucleares $^1H - ^1H$ observadas no experimento de COSY para os hidrogênios NH- CH_α da amostra Surfactina A2 em DMSO- d_6 (500 MHz).....	140
Figura 41. Mapa de correlação $^1H-^1H$ TOCSY e ampliação da região de NH/ H_α , β , γ e δ da substância Surfactina A2 em DMSO- d_6 (500 MHz).....	141
Figura 42. Mapa de correlação ROESY e ampliação da região NH/ H_α da substância Surfactina A2 em DMSO- d_6 (500 MHz).	142
Figura 43. Ampliação H_α/C_α do mapa de correlação $^1H-^{13}C$ de HSQC da amostra Surfactina A2 em DMSO- d_6 (500 MHz).	142

Figura 44. Correlações heteronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas no experimento de HMBC em DMSO- d_6 (500 MHz) para Surfactina A2. (a) sinal metino em δ 5.05 correlacionando com o sinal em δ 172,2 da “Lactona” de Leu 7 (b) correlações para os grupos terminais da cadeia oriunda do ácido graxo.	144
Figura 45. Espectro de DEPT 135° da substância Surfactina A2 em DMSO- d_6 (125 MHz).....	145
Figura 46. Mapas de correlação de $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC em DMSO- d_6 (500 MHz), ampliação das regiões dos grupos da cadeia laterais β -OH ácido graxo. (a) Surfactina A1 (b) Surfactina A3 e (c) Surfactina A4.	155
Figura 47. Espectro de fragmentação do íon ($[\text{M}+\text{H}]^+$) em m/z 1043,5545, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra <i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b (LP164), e respectiva proposta de fragmentação para a isoforma iturina A (C_{14}).....	156
Figura 48. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Iturina A1 em DMSO – d_6 (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N e aromáticos b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos, c) hidrogênios metilênicos e metílicos, d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH_2 , β e γ).....	159
Figura 49. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da amostra Iturina A1 em DMSO- d_6 (500 MHz) da região aromática do resíduo de aminoácido Tyr.	159
Figura 50. Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C da amostra Iturina A1 em DMSO – d_6 (125 MHz): a) região dos carbonos carbonílicos, b) carbonos aromáticos de benzeno <i>para</i> -dissubstituído c) carbonos metínicos, metilênicos e oximetilênico d) carbonos metilênicos e metílico.....	161
Figura 51. Espectro de DEPT 135° da substância Iturina A1 em DMSO- d_6 (125 MHz). a) carbonos aromáticos de benzeno <i>para</i> -dissubstituído b) carbonos metínicos, metilênicos e oximetilênico c) carbonos metilênicos e d) carbono metílico.....	162
Figura 52. Correlações homonucleares $^1\text{H} - ^1\text{H}$ observadas no experimento de COSY para os hidrogênios NH- CH_α da amostra Iturina A1 em DMSO- d_6 (500 MHz).....	163
Figura 53. Espectro de $^1\text{H} - ^1\text{H}$ do TOCSY e ampliação das regiões NH/ H_α , β , γ , e δ da substância Iturina A1 em DMSO- d_6 (500 MHz).....	165
Figura 54. Ampliação das regiões NH/NH de $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de NOESY da substância Iturina A1 em DMSO- d_6 (500 MHz).	166

Figura 55. Ampliação das regiões NH/ H α , β , γ , e δ de $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de NOESY da substância Iturina A1 em DMSO- <i>d</i> 6 (500 MHz).	167
Figura 56. Ampliação da região CH/H α , β e δ do mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de HSQC da substância Iturina A1 em DMSO- <i>d</i> 6 (500 MHz).	168
Figura 57. Ampliação do mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de HMBC da substância Iturina A1 em DMSO- <i>d</i> 6 (500 MHz).	169
Figura 58. Ampliação do mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC correspondente ao final da cadeia do β -amino ácido graxo da substância Iturina A1 em DMSO- <i>d</i> 6 (500 MHz).	170
Figura 59. Ampliação do espectro de RMN de ^1H em DMSO- <i>d</i> 6 (500 MHz) da amostra Iturina A2.	177
Figura 60. Mapa de correlação de $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC em DMSO- <i>d</i> 6 (500 MHz), ampliação das regiões dos grupos das cadeias laterais β -amino ácido graxo: (a) Iturina A2 (b) Iturina A3 (c) Iturina A4 e (d) Iturina A5.	180
Figura 61. Espectro de fragmentação LC-ESI-MS/MS do íon ($[\text{M}+\text{H}]^+$) em m/z 1463,8022 da amostra Fengicina AB1 e proposta de fragmentação para a isoforma fengicina A (C_{16}).	182
Figura 62. Espectro de fragmentação LC-ESI-MS/MS do íon ($[\text{M}+\text{H}]^+$) em m/z 1491,8498 da amostra Fengicina AB1 e proposta de fragmentação para a isoforma fengicina B (C_{16}).	183
Figura 63. Espectro de fragmentação LC-ESI-MS/MS do íon ($[\text{M}+\text{H}]^+$) em m/z 1477,8243 da amostra Fengicina AB2 e proposta de fragmentação para a isoformas: (a) fengicina A (C_{17}) e (b) fengicina B (C_{15}).	184
Figura 64. Teste de viabilidade celular (MTT) - Efeito dos extratos e frações lipopeptídicas de <i>B. amyloliquefaciens</i> sobre a viabilidade de macrófagos de murinos J774A.1.	189
Figura 65. Teste de determinação de nitritos- Efeito dos extratos e frações lipopeptídicas de <i>B. amyloliquefaciens</i> na produção de NO em macrófagos murino J774A.1 estimulados com LPS.	190
Figura 66. Resultado do teste de difusão em ágar para as amostras lipopeptídicas LP50, LP164, LP196, BaP-11, BaP-18 e BaP-24.	193

Figura 67. Curvas de dose-resposta normalizadas das diferentes condições testadas no ensaio de atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> baseado em fluorescência com uso do quinina como droga controle.....	194
Figura 68. Espectros de ESI-MS no modo positivo do fracionamento do extrato LP164 por SPE em escala analítica.	229
Figura 69. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH/H ₂ O 50% (E1).	229
Figura 70. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH/H ₂ O 7:3 (E2).	230
Figura 71. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH/H ₂ O 75:25 (E3).	230
Figura 72. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH/H ₂ O 8:2 (E4).	231
Figura 73. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH/H ₂ O 85:15 (E5).	231
Figura 74. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH/H ₂ O 9:1 (E6).	232
Figura 75. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH/H ₂ O 95:05 (E7).	232
Figura 76. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH 100% (E8).	233
Figura 77. Espectro de fragmentação do íon ([M+H] ⁺) em <i>m/z</i> 1008,6654, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Surfactina A1 de <i>B. amyloliquefaciens</i> , e repectiva proposta de fragmentação para a isoforma Surfactina A (C ₁₃).	234
Figura 78. Espectro de fragmentação do íon ([M+H] ⁺) em <i>m/z</i> 1022,6748, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Surfactina A3 de <i>B. amyloliquefaciens</i> , e repectiva proposta de fragmentação para a isoforma Surfactina A (C ₁₄).	235
Figura 79. Espectro de fragmentação do íon ([M+H] ⁺) em <i>m/z</i> 1036,6967, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Surfactina A4 de <i>B. amyloliquefaciens</i> , e repectiva proposta de fragmentação para a isoforma Surfactina A (C ₁₅).	236
Figura 80. Espectro de fragmentação do íon ([M+H] ⁺) em <i>m/z</i> 1050,7049, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Surfactina A5 de <i>B. amyloliquefaciens</i> , e repectiva proposta de fragmentação para a isoforma Surfactina A (C ₁₆).	237

Figura 81. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Surfactina A1 em DMSO- <i>d</i> 6 (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N; b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos; c) hidrogênios metilênicos e metílicos; d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH ₂ , β e γ).....	239
Figura 82. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Surfactina A3 em DMSO- <i>d</i> 6 (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N; b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos; c) hidrogênios metilênicos e metílicos; d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH ₂ , β e γ).....	243
Figura 83. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Surfactina A4 em DMSO- <i>d</i> 6 (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N; b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos; c) hidrogênios metilênicos e metílicos; d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH ₂ , β e γ).....	247
Figura 84. Espectro de fragmentação do íon ($[\text{M}+\text{H}]^+$) em m/z 1057,5661, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Iturina A2 de <i>B. amyloliquefaciens</i> , e respectiva proposta de fragmentação para a isoforma iturina A (C ₁₅).....	250
Figura 85. Espectro de fragmentação do íon ($[\text{M}+\text{H}]^+$) em m/z 1071,5808, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Iturina A3 de <i>B. amyloliquefaciens</i> , e respectiva proposta de fragmentação para a isoforma iturina A (C ₁₆).....	251
Figura 86. Espectro de fragmentação do íon($[\text{M}+\text{H}]^+$) em m/z 1071,5859, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Iturina A4 de <i>B. amyloliquefaciens</i> , e respectiva proposta de fragmentação para a isoforma iturina A (C ₁₆).....	252
Figura 87. Espectro de fragmentação do íon ($[\text{M}+\text{H}]^+$) em m/z 1085,5997, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Iturina A5 de <i>B. amyloliquefaciens</i> , e respectiva proposta de fragmentação para a isoforma iturina A (C ₁₇).....	253
Figura 88. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Iturina A2 em DMSO- <i>d</i> 6 (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N e aromáticos; b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos; c) hidrogênios metilênicos e metílicos; d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH ₂ , β e γ).....	255
Figura 89. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Iturina A3 em DMSO- <i>d</i> 6 (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N e aromáticos; b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos; c) hidrogênios metilênicos e metílicos; d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH ₂ , β e γ).....	259

Figura 90. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Iturina A4 em DMSO-*d*6 (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N e aromáticos; b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos; c) hidrogênios metilênicos e metílicos; d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH₂, β e γ)..... 263

Figura 91. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Iturina A5 em DMSO-*d*6 (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N e aromáticos; b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos; c) hidrogênios metilênicos e metílicos; d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH₂, β e γ)..... 267

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns metabólitos isolados de <i>Bacillus</i> ssp. e suas atividades biológicas.	37
Tabela 2. Família da Surfactina.	58
Tabela 3. Família da Iturina.	59
Tabela 4. Família da Fengicina.	63
Tabela 5. Bactérias endofíticas de plantas medicinais da Amazônia.	69
Tabela 6. Variáveis e níveis para o planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central.	74
Tabela 7. Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central. ...	74
Tabela 8. Frações da escala preparativa.	77
Tabela 9. Amostras de iturinas submetidas à análise de RMN 1D e 2D e MS ²	80
Tabela 10. Amostras de fengicina submetidas à análise de RMN 1D e 2D e MS ²	81
Tabela 11. Amostras de fengicina submetidas à análise de RMN 1D e 2D e MS ²	82
Tabela 12. Linhagens bacterianas utilizadas no ensaio de atividade antibacteriana.	84
Tabela 13. Classificação adotada para a atividade antiplasmódica.	86
Tabela 14. Comparação molecular dos isolados GhcC1 2.1a, PpC1 2.2b e DgcR2 1.1b com bactérias depositadas no GenBank.	90
Tabela 15. Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para verificar a influência de 4 variáveis (v1 a v4) no rendimento da produção de lipopeptídeos de <i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b (LP164).	93
Tabela 16. Condições experimentais do planejamento fatorial composto central realizado para <i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b (LP164).	95
Tabela 17. Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para verificar a influência de 4 variáveis (v1 a v4) no rendimento da produção de lipopeptídeos de <i>B. amyloliquefaciens</i> GhcC1 2.1a (LP50).	104
Tabela 18. Condições experimentais do planejamento fatorial composto central realizado para <i>B. amyloliquefaciens</i> GhcC1 2.1a (LP50).	106

Tabela 19. Planejamento fatorial fracionário 2 ⁴⁻¹ para verificar a influência de 4 variáveis (v1 a v4) no rendimento da produção de lipopeptídeos de <i>B. amyloliquefaciens</i> DgcR2 1.1b (LP196).	113
Tabela 20. Condições experimentais do planejamento fatorial composto central realizado para <i>B. amyloliquefaciens</i> DgcR2 1.1b (LP196).	115
Tabela 21. Produção de lipopeptídeos a partir dos modelos gerados pela Anova para <i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b (LP164), <i>B. amyloliquefaciens</i> GhcC1 2.1a (LP50) e <i>B. amyloliquefaciens</i> DgcR2 1.1b (LP196).	122
Tabela 22. Dados de RMN 1D e 2D da amostra Surfactina A2 – Surfactina A (<i>normal-C</i> ₁₄).	146
Tabela 23. Íons detectados por fragmentação (LC-ESI-MS/MS) dos homólogos da surfactina a partir dos íons percusores de m/z 1008, 1022, 1036 e 1050. ...	152
Tabela 24. Dados de RMN1De 2D da amostra Iturina A1 – Iturina A (<i>normal-C</i> ₁₄).	171
Tabela 25. Atribuição por LC-ESI-MS/MS dos homólogos protonados da fengicina presentes nas amostras Fengicina AB1 e Fengicina AB2 de <i>B. amyloliquefaciens</i> (LP164).	185
Tabela 26. Lipopeptídeos identificados de <i>B. amyloliquefaciens</i> (LP164) por LC-ESI-MS/MS e RMN.	186
Tabela 27. Critério de avaliação da atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar.....	191
Tabela 28. Resultados das amostras LP50, LP164, LP196, BaP-11, BaP-18 e BaP-24, testadas frente as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.	192
Tabela 29. Concentração Mínima Inibitória (CMI) das amostras LP164 e LP196 testadas frente a <i>K.pneumoniae</i> , na concentração inicial de 1000 a 3,90 µg/mL.	193
Tabela 30. Atividade antiplasmódica dos extratos e substâncias lipopeptídicas de acordo com p-valor.....	194
Tabela 31. Dados de RMN de ¹ H e HMBC, da amostra Surfactina A1-Surfactina A (<i>iso-C</i> ₁₃ e <i>anteiso-C</i>).	239
Tabela 32. Dados de RMN de ¹ H e HMBC, da amostra Surfactina A3-Surfactina A (<i>iso-C</i> ₁₄).	243

Tabela 33. Dados de RMN de ^1H e HMBC, da amostra Surfactina A4-Surfactina A (<i>iso-C</i> ₁₅ e <i>anteiso-C</i> ₁₅).....	247
Tabela 34. Dados de RMNN de ^1H e HMBC, da amostra Iturina A2.	255
Tabela 35. Dados de RMNN de ^1H e HMBC, da amostra Iturina A3.	259
Tabela 36. Dados de RMNN de ^1H e HMBC, da amostra Iturina 4.....	263
Tabela 37. Dados de RMN de ^1H e HMBC, da amostra Iturina A5.	267

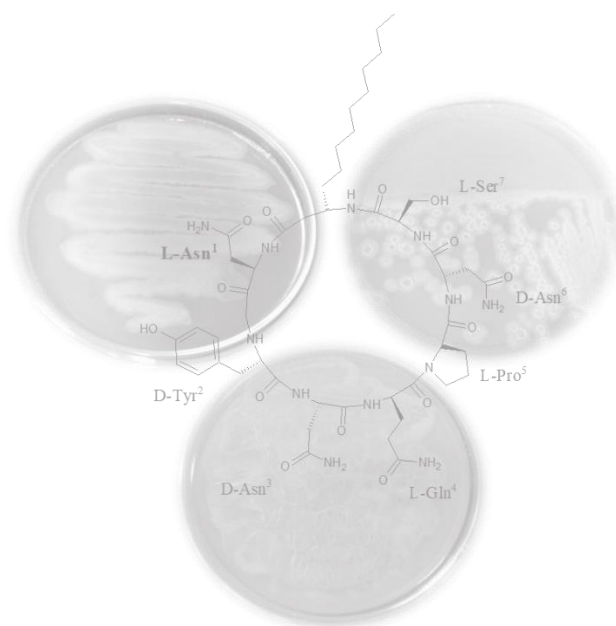
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. OBJETIVOS	29
2.1 Geral.....	30
2.2 Específicos	30
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1 Microrganismos Endofíticos	32
3.1.1 Bactérias endofíticas	33
3.2 Bactérias do Gênero <i>Bacillus</i>	35
3.2.1 Metabólitos secundários produzidos por <i>Bacillus</i>	37
3.2.2 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	44
3.3 Lipopeptídeos produzidos por bactérias.....	45
3.3.1 Família da Surfactina.....	52
3.3.2 Família da Iturina.....	59
3.3.3 Família da Fengicina	62
3.3.5 Otimização da produção de lipopeptídeos	66
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
4.1 Seleção das linhagens de bactérias endofíticas produtoras de lipopeptídeos	69
4.2 Caracterização morfológica e análise por biologia molecular das linhagens bacterianas.....	69
4.2.1 Coloração de Gram	69
4.2.2 Classificação por biologia molecular	70
4.3 Seleção do meio de cultivo para a produção dos lipopeptídeos.....	71
4.4 Cultivo e extração dos lipopeptídeos em escala analítica	72
4.4.1 Obtenção dos extratos lipopeptídicos.....	73
4.5 Avaliação da produção de lipopeptídeos por Planejamento fatorial	73

4.6 Cultivo em escala ampliada da linhagem PpC1 2.2b	75
4.7 Estudo cromatográfico para purificação dos lipopeptídeos	75
4.7.1 Cromatografia em cartucho de SPE- escala analítica	75
4.7.2 Cromatografia em cartucho de SPE- escala preparativa.....	77
4.7.3 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (HPLC)	78
4.7.4 Métodos espectrométricos e espectroscópicos.....	78
4.7.5 Estudo do perfil químico dos extratos e frações lipopeptídicas por ESI-MS ou APCI-MS	79
4.7.6 Análises das frações lipopeptídicas de PpC1 2.2b por HPLC.....	79
4.7.7 Estudo cromatográfico e isolamento dos lipopeptídeos da família da iturina	79
4.7.8 Estudo cromatográfico e isolamento dos lipopeptídeos da família da surfactina.....	81
4.7.9 Estudo cromatográfico e isolamento dos lipopeptídeos da família da fengicina.....	81
4.8 Ensaio Biológicos	82
4.8.1 Ensaio de viabilidade celular	83
4.8.2 Determinação de nitrito (NO ₂ ⁻).....	83
4.8.3 Atividade antibacteriana	84
4.8.4 Atividade Antiplasmódica	86
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
5.1 Identificação por biologia molecular e morfológica das linhagens bacteriana.....	88
5.1.1 Identificação morfológica.....	88
5.1.2 Identificação molecular.....	88
5.2 Otimização da produção dos lipopeptídeos.....	90
5.3 Otimização das condições de cultivo por planejamento fatorial	92
5.3.1 Otimização para a linhagem <i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b (LP164).	92

5.3.2 Otimização para a linhagem <i>B. amyloliquefaciens</i> GhcC1 2.1a (LP50). ..	103
5.3.2 Otimização para a linhagem <i>B. amyloliquefaciens</i> DgcR2 1.1b (LP196). ..	113
5.4. Análises do perfil químico dos extratos lipopeptídicos	123
5.5 Análises por espectrometria de massas das frações de PpC1 2.2b (LP164)	124
5.6 Análises por LC-MS das frações de PpC1 2.2b (LP164)	126
5.7 Determinação estrutural dos lipopeptídeos isolados de <i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b (LP164).....	129
5.7.1 Determinação estrutural das surfactinas por LC-ESI-MS/MS.....	131
5.7.2 Determinação estrutural da amostra Surfactina A2 por RMN.....	133
5.7.3 Determinação estrutural das demais surfactinas por LC-ESI-MS/MS	151
5.7.4 Determinação estrutural das demais surfactinas por RMN	152
5.7.5 Determinação estrutural das iturinas por LC-ESI-MS/MS	155
5.7.6 Determinação estrutural das iturinas por RMN.....	157
5.7.7 Determinação estrutural das demais iturinas por LC-ESI-MS/MS	176
5.7.8 Determinação estrutural das iturinas por RMN.....	176
5.7.9 Determinação estrutural dos lipopeptídeos da fengicina por LC-ESI- MS/MS	181
5.7.10 Substâncias lipopeptídicas identificadas de <i>B. amyloliquefaciens</i> (LP164)	185
5.8 Ensaios Biológicos	187
5.8.1 Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	187
5.8.2 Ensaios Antimicrobianos	191
5.8.3 Teste de atividade antiplasmódica	193
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	196
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	198
8. APÊNDICE	228

1.INTRODUÇÃO



A biodiversidade amazônica representa uma importante e inestimável fonte biológica de novos produtos naturais com elevado potencial farmacêutico e biotecnológico. Em meio a esta grande diversidade biológica destacamos os microrganismos endofíticos, os quais estão associados aos tecidos internos das plantas, representados em grande parte por fungos e bactérias.

O estudo do uso do potencial químico e biológico de microrganismos endofíticos é relativamente recente, porém vem despertando cada vez mais interesse dos pesquisadores pôr possuírem ampla diversidade genética. Esse fato deve-se principalmente aos aspectos vantajosos que estes microrganismos possuem de adaptação a condições ambientais bastante variadas, incluindo ambientes com variações extremas de pH e temperatura, o que lhes confere a capacidade de produção de diversas substâncias com grande potencial biológico.

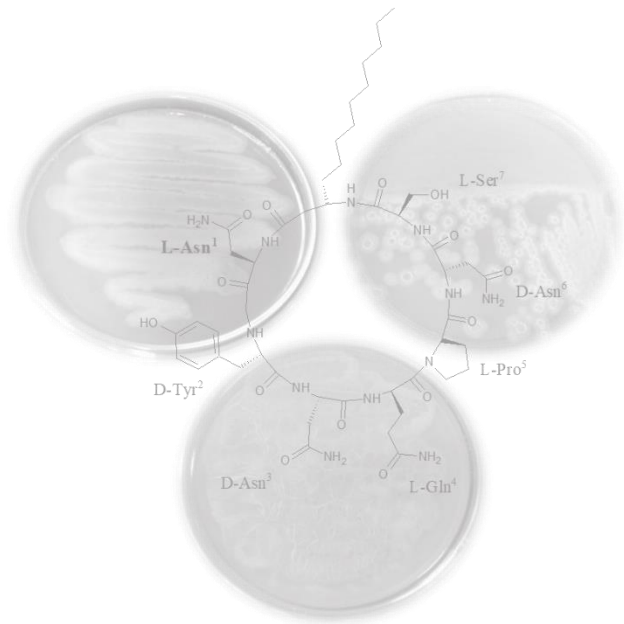
O gênero *Bacillus* possui uma variedade de espécies importantes industrialmente, as quais podem ocorrer como bactérias endofíticas. As espécies deste gênero são as maiores produtoras de lipopeptídeos bioativos com histórico de uso seguro tanto em alimentos quanto na indústria. Os lipopeptídeos são sintetizados pelas bactérias endofíticas por via não ribossomal durante processos de fermentação, nos quais diferentes variações destas moléculas podem ser obtidas, dependendo da linhagem selecionada e das condições nutricionais de cultivo. Porém, as principais limitações na produção de lipopeptídeos são aumento de rendimento e redução de custos. Melhorar os processos de produção dos lipopeptídeos depende de vários fatores, como a seleção de cepas produtoras e as técnicas apropriadas de extração, purificação e a otimização das condições do meio de cultivo.

A busca por novos lipopeptídeos em grande parte depende da seleção de linhagens produtoras. Assim, os endófitos bacterianos de regiões geográficas pouco exploradas, como a região amazônica, podem ser fontes de novos compostos lipopeptídicos bioativos.

Diante do exposto, o presente estudo visou contribuir para o conhecimento químico e biológico de espécies do gênero *Bacillus* obtidas como linhagens endofíticas de plantas da Amazônia. Foi realizado um estudo sobre a otimização da produção de lipopeptídeos, a investigação da natureza química e biológica de lipopeptídeos de uma das linhagens em busca de novos metabólitos e ensaios de

extratos, frações e substâncias para verificar a ocorrência de atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antiplásmica.

2. OBJETIVOS



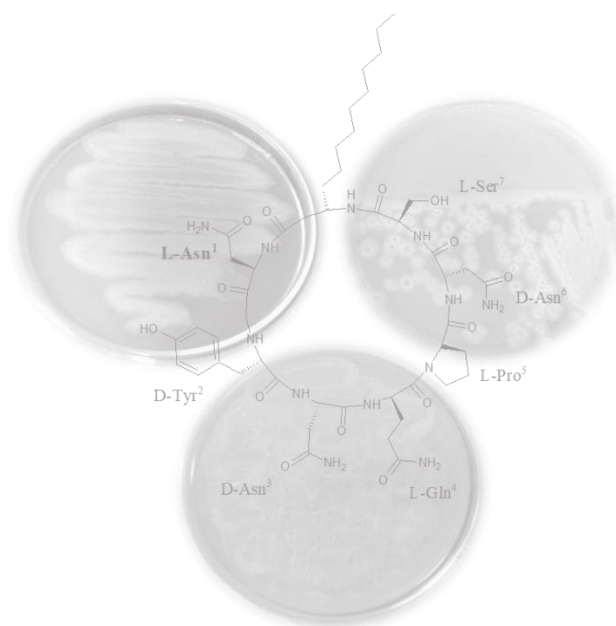
2.1 Geral

Investigar a natureza química e o potencial biológico de lipopeptídeos de linhagens selecionadas de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia.

2.2 Específicos

- Selecionar e identificar três linhagens de bactérias endofíticas como produtoras de lipopeptídeos;
- Investigar parâmetros de cultivo que melhorem a produção dos lipopeptídeos pelas linhagens selecionadas;
- Purificar e identificar lipopeptídeos de pelo menos uma das linhagens selecionadas;
- Avaliar os extratos, frações, e lipopeptídeos puros dessa linhagem em ensaios de atividade antimalárica, antibacteriana e anti-inflamatória.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



3.1 Microrganismos Endofíticos

Os microrganismos podem ser associados a plantas de várias formas, podendo estar presentes tanto externamente quanto internamente em sua planta hospedeira. Os epifíticos são aqueles que vivem nas superfícies foliares das plantas ou rizoféricas que habitam as raízes no solo (COMPANT et al., 2010). Por sua vez, os microrganismos que vivem e prosperam dentro da planta hospedeira são chamadas de endofíticos (HARDOIM et al., 2008). Os endófitos compreendem principalmente fungos e bactérias (PETRINI et al., 1991; SCHULZ & BOYLE, 2005), porém algas (PETERS, 1991), insetos (FELLER, 1995), micorrizas e bactérias fixadoras de nitrogênio (AZEVEDO et al., 2000) também podem ser inseridos neste grupo.

Embora já tenham sido descritos no século passado, os microrganismos endofíticos passaram a ser melhor analisados nas últimas décadas, quando se reconheceu sua capacidade de conferir efeitos benéficos aos seus hospedeiros vegetais. Logo, fungos e bactérias passaram a ser melhor analisados e ficou claro que, em muitos casos, podem desenvolver associações benéficas com as plantas através da produção de substâncias especiais (GUNATILAKA et al., 2006; SANTOYO et al., 2016), principalmente metabólitos secundários, protegendo assim seus hospedeiros contra insetos-pragas, herbívoros domésticos e fitopatógeno (HARDOIM et al., 2008; ALVIN et al., 2014). Os microrganismos endofíticos também fornecem ou ajudam as plantas na absorção de micronutrientes, como fósforo e nitrogênio (HARDOIM et al., 2008, JOSHEE et al., 2007), podem conferir maior resistência a condições de estresse bióticos e abióticos (MILIUTE et al., 2015) e são capazes de produzir fitohormônios e outros compostos de interesse biotecnológico, como enzimas e drogas farmacêuticas (HARDOIM et al., 2015; SANTOYO et al., 2016).

Um dos exemplos mais bem-sucedidos de produtos naturais de endófitos é o medicamento anticâncer taxol (paclitaxel) (Figura 1). Este composto foi inicialmente isolado de uma planta medicinal tradicional (*Taxus brevifolia*) utilizada pelos nativos americanos (GUNTHER, 1945). A investigação do endófito dessa planta revelou que o fungo *Taxomyces andreanea*, também foi capaz de produzir este complexo diterpenóide, com atividade antimetabólica utilizado contra câncer de

ovário e de mama, bem como no tratamento de inúmeras doenças proliferativas de humanos (PRAKASH et al., 2016).

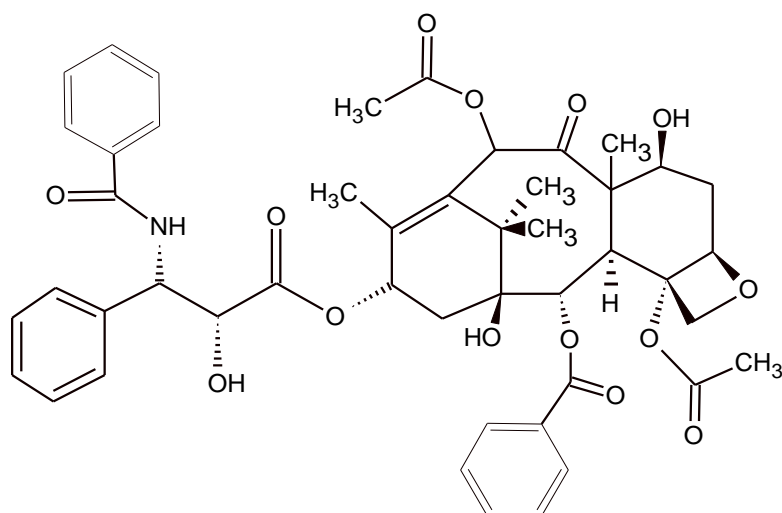


Figura 1. Taxol.

Os endófitos são capazes de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários bioativos das mais variadas classes: peptídeos, alcalóides, flavonóides, ácidos fenólicos, quinonas, esteróides, terpenóides, entre outros (TAN & ZOU, 2001; YU et al., 2010, SUMI et al., 2015; WICAKSONO et al., 2018). Esses metabólitos bioativos encontram ampla aplicação na indústria farmacêutica, incluindo antimicrobianos, antivirais, anticâncer, antioxidantes, antidiabéticos, imunossuppressores e antiparasitários, e na agricultura incluindo agroquímicos e promotores do crescimento de plantas (STROBEL et al., 2002; ZHANG et al., 2013; WICAKSONO et al., 2018; ZGHAL et al., 2018).

3.1.1 Bactérias endofíticas

A constatação de bactérias endofíticas em tecidos de plantas saudáveis tem sido amplamente relatada (HINTON & BACON, 1995; STURZ, et al., 2000; DUHAN et al., 2020). A fim de obter uma melhor compreensão dos fatores que determinam a colonização de bactérias endofíticas bem como a sua sustentação de vida dentro das plantas hospedeira, foram analisados e comparados os genomas de diferentes bactérias endofíticas (MITTER et al., 2013). Os resultados desta pesquisa mostraram que esses endófitos não só diferem no tamanho da sequência genômica, mas também no estilo de vida endofítico; alguns possuem

hospedeiros muito restritos e são encontrados exclusivamente em plantas, enquanto outros tem a capacidade de habitar em diferentes plantas e também são bons colonizadores de outros ambientes, como solo ou a rizosfera.

De acordo com suas estratégias de vida, os endófitos bacterianos podem ser classificados como facultativos ou obrigatórios. As bactérias endofíticas facultativas podem sobreviver fora da planta hospedeira durante um período do seu ciclo de vida, alternando entre plantas e ambiente, sendo capazes de sobreviver no solo, na superfície da planta, e no interior das plantas (FRANK et al., 2017). A grande maioria dos microrganismos que colonizam o interior das plantas provavelmente tem uma propensão a esse estilo de vida bifásico. No entanto, as bactérias endofíticas obrigatórias dependem da planta hospedeira para sua sobrevivência e atividade metabólicas podendo ser transmitidas de geração em geração através de sementes ou tecidos vegetais vegetativos (SU et al., 2010).

Muitas espécies de bactérias endofíticas cultiváveis (tanto gram-positivas como gram-negativas) foram isoladas e relatadas a partir de uma grande variedade de plantas terrestres e aquáticas (STURZ et al., 2000; BHOORE et al., 2010; KANDEL, et al., 2017), embora em número inferior ao das bactérias rizosféricas (LODEWYCKX et al., 2002; KANDEL, et al., 2017). Os gêneros bacterianos endofíticos mais comumente isolados até 2010 foram *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Actinobacteria*, *Sphingomonas* e alguns gêneros pertencem à família *Enterobacteriaceae* (PIRTTILA &FRANK, 2011).

As bactérias endofíticas são capazes de adentrar na planta através de feridas ou aberturas naturais e podem ser isolados dos diversos tecidos vegetais: tubérculos, raízes, caules, folhas e frutos (HARDOIM et al., 2015; MITTER et al., 2017; TRUYENS et al., 2015). Cada espécie de planta pode ser um hospedeiro para vários gêneros e espécies bacterianas endofíticas. A presença de espécies bacterianas endofíticas e sua densidade populacional é altamente variável, dependendo das espécies bacterianas, genótipos do hospedeiro e condições ambientais (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; CHEBOTAR et al., 2015).

Endófitos bacterianos interagem com plantas através da produção de fitohormônios, solubilização de fosfato, amônia, ácido cianídrico (COMPANT et al.,

2005; TAGHAVI et al., 2009; RAJKUMAR et al., 2006; AFZAL et al., 2019), e através da produção de enzimas (NAGARAJKUMAR et al., 2004; TAGHAVI et al., 2009). Em troca, os endófitos bacterianos podem ser beneficiados pelos vários metabólitos secundários produzidos pelas plantas hospedeiras além de proteção contra fatores bióticos e abióticos (SCHULZ & BOYLE, 2005). Eles também possuem um papel superior na promoção do crescimento das plantas em comparação às rizobactérias (RYAN et al., 2008; KUMAR et al., 2015).

Além disso, outras diferentes classes de produtos naturais, como antibacterianos, antibióticos, antifúngicos, antivirais, inseticidas voláteis têm sido relatados como sendo produzidos por endófitos bacterianos (KHAN et al., 2008, KUMAR, et al., 2015, SINGH et al., 2017; NARAYANA et al., 2017). Recentemente, importantes antibióticos foram encontrados a partir de endófitos de diferentes espécies de plantas. (ELJOUNAIDI et al., 2016; PANDEY et al., 2017; JAKUBIEC-KRZESNIAK et al., 2018; TRIPATHI et al., 2018). As cepas endofíticas de *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Serratia* tem sido as mais eficazes na supressão do crescimento de microrganismos patogênicos em condições tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MERCADO-BLANCO et al., 2014; ESMAEEL et al., 2016; KANDEL et al., 2017).

3.2 Bactérias do Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* compreende um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, formadoras de endósporos, e são caracterizados pela morfologia de bastonetes com extremidades retas ou arredondadas de tamanhos variáveis (0,5 x 1,2 µm até 2,5 x 10 µm). Espécies de *Bacillus* são onipresentes na natureza, tendo sido isoladas de ambientes tão diversos como água doce, água salgada, solo, plantas, animais, argilas, pedras, poeira, alimentos, ar e trato gastrointestinal de vários insetos e animais (PIGNATELLI et al., 2009; TEJERA-HERNÁNDEZ et al., 2011).

Esta capacidade de sobreviver e crescer em diferentes ecossistemas é baseada na produção de seus endósporos robustos e na sua diversidade com relação a suas propriedades fisiológicas e seus requisitos para crescimento (SLEPECKY & HEMPHILL, 2006). As diferentes espécies de *Bacillus* apresentam propriedades fisiológicas bastante diversificadas, tais como a capacidade de

degradar muitos tipos diferentes de substratos derivados de fontes vegetais e animais, incluindo a celulose, amido, proteínas, hidrocarbonetos e também biocombustíveis (SLEPECKY & HEMPHILL, 2006).

O estudo do gênero bacteriano *Bacillus* iniciou durante a década de 1870, onde Ferdinand Cohn, que trabalhava na Universidade de Breslau na Polônia, isolou bactérias móveis e aeróbicas, chamando de *Bacillus subtilis*, significando “haste fina”. Cohn (1872), descreveu com precisão o ciclo de vida de *Bacillus*, demonstrando a formação, resistência ao calor, a germinação e crescimento de endósporos (CONH, 1872). Quando Robert Koch estabeleceu que um organismo fenotipicamente similar, o *B. anthracis* era o agente causador da doença antraz (KOCH, 1876), houve uma crescente importância científica desse novo grupo de microrganismos. Nos 50 anos seguintes, muitas novas bactérias formadoras de endósporos foram identificadas, no entanto, devido a ferramentas limitadas, a nomenclatura e classificação dessas espécies bacterianas foram muitas vezes confusas e desordenadas. O desafio de trazer ordem à taxonomia de *Bacillus* foi recebido com admirável dedicação por Nathan R. Smith, Francis E. Clark e Ruth E. Gordon nas décadas de 1930 e 1940 (GORDON et al., 1973). Os resultados obtidos foram publicados em 1973, na monografia “O gênero *Bacillus*” (GORDON et al, 1973), onde Gordon e colaboradores forneceram descrições detalhadas de 18 espécies de *Bacillus*, em conjunto com uma bateria de 33 testes morfológicos e fisiológicos que tornaria possível atribuir inequivocamente a maioria dos isolados conhecidos a uma dessas espécies. Mais recentemente, o uso da biologia molecular para a taxonomia do gênero *Bacillus* desafiou o paradigma existente de que o gênero era composto de um pequeno número de espécies rigorosamente definidas e identificáveis por certas características fenotípicas. Desde então estudos utilizando a análise da sequência do gene 16S rRNA confirmam os altos níveis de heterogeneidade filogenética do gênero *Bacillus* (GARVEBA et al., 2003). Atualmente (2020), conforme o site “LPSN- List of Prokaryotic names with Standing in nomenclature”, do pesquisador J.P. Euzéby, o gênero *Bacillus* consiste de 541 espécies publicados validamente (<http://www.bacterio.net/bacillus.html>). As principais espécies industriais são *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. megaterium* e *B. licheniformis* (FAN et al., 2017).

As espécies de *Bacillus* apresentam uma vasta gama de requisitos nutricionais, condições de crescimento, composições de bases do DNA e maior composição de aminoácidos. A maioria das espécies deste grupo são consideradas inofensivas para humanos e animais, e apenas algumas são patogênicas, tais como, *B. anthracis*, causador do antrax e *B. cereus*, causador de gastroenterite e outras infecções (CLAUS & BERKELEY, 1986).

3.2.1 Metabólitos secundários produzidos por *Bacillus*

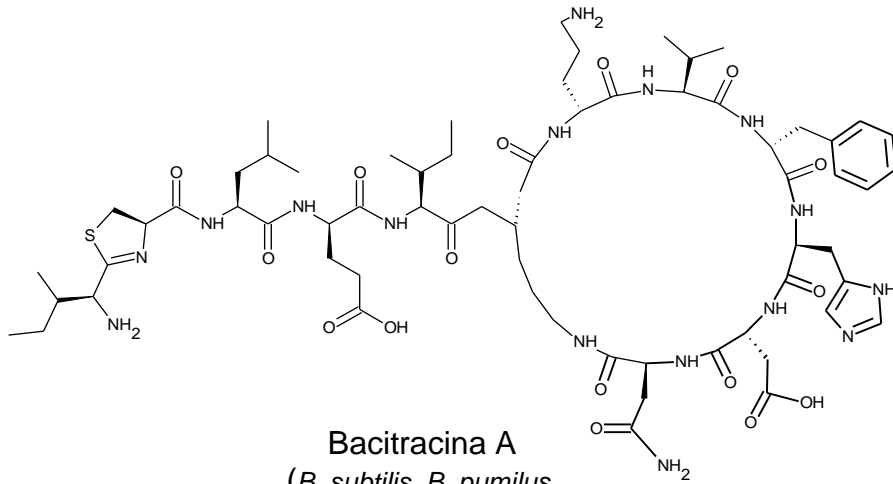
As cepas de *Bacillus* são produtores importantes de metabólitos secundários bioativos com aplicação em diferentes setores da indústria de alimentos, farmacêutica e agricultura. (AYED et al., 2017). As várias classes de substâncias bioativas relatadas em espécies de *Bacillus*, são: lipopeptídeos, bacteriocinas, policetídeos, alcalóides, sideróforos, isocumarinas, aminopoliol e pigmentos (Tabela 1). Dentre estas os policetídeos e peptídeos não ribossomais constituem uma das classes mais importantes com ampla atividade biológica (ABDERRAHMANI et al., 2011; MOYNE et al., 2004; HELFRICH & PIEL, 2016; COCHRANE & VEDERAS, 2016).

Tabela 1. Alguns metabólitos isolados de *Bacillus* ssp. e suas atividades biológicas.

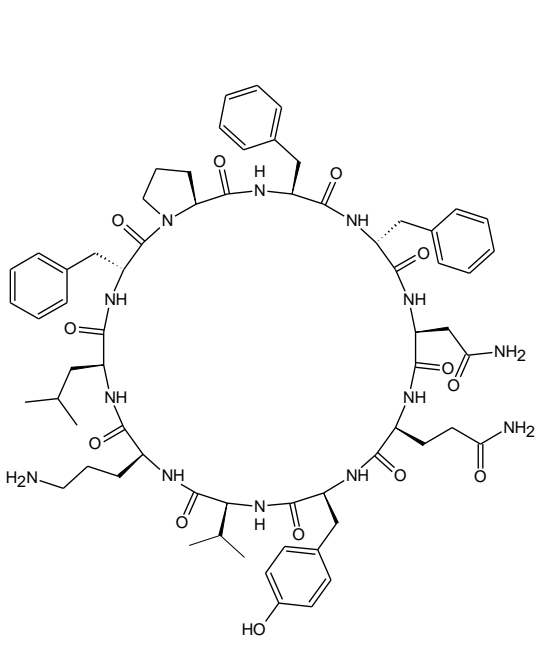
Classe	Metabólitos secundários	Produtor	Atividades biológicas	Referência
Policetídeos	Bacillaena	<i>B. subtilis</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i>	Antibacteriana	BUTCHER et al., 2007, HELFRICH & PIEL (2016)
	Difficidina	<i>B. subtilis</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i>	Antibacteriana	CHEN et al., 2009, HELFRICH & PIEL, 2016
	Macrolactina	<i>B. subtilis</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i>	Antibacteriana e antiviral	HELFRICH & PIEL, 2016, SCHNEIDER et al., 2007
	Surfactina	<i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. polyfermenticus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. licheniformis</i>	Antimicrobiana, antiviral e surfactante	ALETI et al., 2015, ONGENA & JACQUES, 2008, QI et al., 2010; SUMI et al., 2015; SUN et al., 2006; ULLRICH et al., 1991
	Fengicina	<i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i>	Antifúngica	ALETI et al., 2015, ONGENA e JACQUES, 2008, QI et al., 2010; SUMI et al., 2015; SUN et al., 2006
	Plipastatina	<i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i>	Antifúngica	ONGENA & JACQUES, 2008, QI et al., 2010; SUMI et al., 2015;

Lipopeptídeos cíclicos	Iturina	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i>	Antimicrobiana	ALETI et al., 2015, ONGENA & JACQUES, 2008, QI et al., 2010; SUMI et al., 2015
	Mojavensin	<i>B. mojavensis</i>	Antimicrobiana	MA et al., 2012
	Bacillomicina	<i>B. subtilis</i>	Antimicrobiana	COCHRANE & VEDERAS, 2016; KOUMOUTSI et al., 2004, SUMI et al., 2015
	Micosubtilina	<i>B. subtilis</i>	Antimicrobiana	COCHRANE & VEDERAS, 2016; LECLERE et al., 2005,
	Kurstakin	<i>B. thurigiensis</i>	Antifúngica	BECHET et al., 2012, HATHOUT et al., 2012
	Thumolycina	<i>B. thurigiensis</i>	Antifúngica	ZHIYONG et al., 2018
	Daitocidina	<i>B. pumilus</i>	Antifúngica	CHAABONI, et al., 2012, CARRILO et al., 2003, TENDULKAR et al., 2007
	Pumilacidina	<i>B. pumilus</i>	Antifúngica	CHAABONI, et al., 2012, CARRILO et al., 2003, TENDULKAR et al., 2007
	Marihysin	<i>B. marinus</i>	Antifúngica	LIU et al., 2010
	Bacircine	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Antifúngica	CHAABONI, et al., 2012, CARRILO et al., 2003, TENDULKAR et al., 2007
	Halobacillina	<i>B. licheniformis</i>	Antifúngica	CHAABONI, et al., 2012, CARRILO et al., 2003, TENDULKAR et al., 2007
	Isohalobacillina	<i>B. licheniformis</i>	Antifúngica	CHAABONI, et al., 2012, CARRILO et al., 2003, TENDULKAR et al., 2007
	Lichenisina	<i>B. licheniformis</i>	Antifúngica	CHAABONI, et al., 2012, CARRILO et al., 2003, TENDULKAR et al., 2007
	Bamylocina	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Antifúngica	LEE et al., 2007
Lipopeptídeos lineares	Baciloletrina	<i>B. subtilis</i>	Antibacteriana	TAREQ et al., 2017
	Bacillopeptina B ₁	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Antibacteriana	MA et al., 2014
	Locillomicina	<i>B. subtilis</i>	Antibacteriana	LUO et al., 2015
Outros peptídeos não ribossomais	Gageopeptina	<i>B. subtilis</i>	Antifúngica	TAREQ et al., 2015
	Gageostatina	<i>B. subtilis</i>	Antifúngica	TAREQ et al., 2014a
	Gageotetrina	<i>B. subtilis</i>	Antifúngica	TAREQ et al., 2014b
	Gageopeptideo	<i>B. subtilis</i>	Antifúngica	TAREQ et al., 2014c
	Mixirins A-C	<i>Bacillus sp.</i>	Anticâncer	ZHANG et al., 2004
	Bacilisina	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i>	Antimicrobiana	CHEN et al., 2009, HELFRICH & PIEL, 2016
Outros peptídeos não ribossomais	Tirocidina	<i>B. brevis</i>	Antibacteriana	DANDERS et al., 1982; LOLL et al., 2014; LIOU et al., 2015; VAN EPPS et al., 2006
	Gramicidina	<i>B. brevis</i>	Antibacteriana	AWAIS et al., 2007,
	Bacitracina	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. licheniformis</i>	Antibacteriana	ZAREI et al., 2012; SUMI et al, 2015
	Polypeptina	<i>B. circulans</i>	Antimicrobiana	ALETI et al., 2015

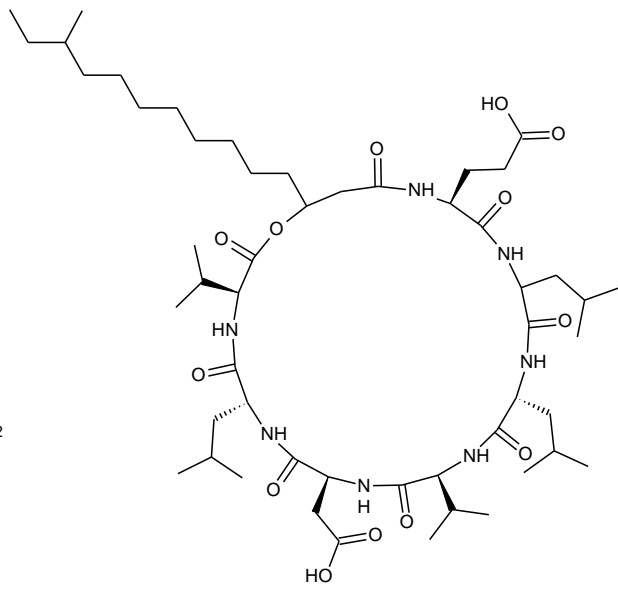
	Octapeptina	<i>B. circulans</i>	Antibacteriana	ALETI et al., 2015, COCHRANE e VEDERAS, 2016
Peptídeos lineares	Cerexin Tridecaptina	<i>B. cereus</i> <i>B. circulans</i>	Antibacteriana Antibacteriana	COCHRANE et al., 2015 COCHRANE et al., 2015 COCHRANE et al., 2016
Bacteriocinas/Lantibióticos	Subtilina	<i>B. subtilis</i>	Antibacteriana	STEIN, 2005, SUMI et al., 2015
	Amylolisina	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Antimicrobiana	SUMI et al., 2015; ARGUELLES-ARIAS et al., 2013
	Amylociclicina	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Antimicrobiana	SUMI et al., 2015; ABRIOUEL et al., 2011
	Subtilolisina	<i>B. subtilis</i>	Antibacteriana	SUMI et al., 2015; ABRIOUEL et al., 2011
	Mersacidina	<i>B. subtilis</i>	Antibacteriana	SUMI et al., 2015; ABRIOUEL et al., 2011
Inseticidas	Cry proteins	<i>B. thuringiensis</i>	Inseticida	SANSINENEA et al., 2012
	Vip proteins	<i>B. thuringiensis</i>	Inseticida	SANSINENEA et al., 2012
	Thuringiensina	<i>B. thuringiensis</i>	Inseticida	ESPINASSE et al., 2002
Sideróforos	Bacillibactina	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i>	Quelantes de ferro	SEGOND et al., 2014; ZAWADZKA et al., 2009
	Petrobactina	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i>	Quelantes de ferro	ZAWADZKA et al., 2009
	3,4-ácido dihidroxibenzoico (3,4-DHB)	<i>B. cereus</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>B. thuringiensis</i>	Quelantes de ferro	ZAWADZKA et al., 2009
Isocumarinas	Amicoumacina A-C	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i>	Antibacteriana	PINCHUK et al., 2002
	Xenocoumacina	<i>B. subtilis</i>	Antibacteriana	LIU et al., 2013
	Bacilosarcinas A-B	<i>B. subtilis</i>	Antibacteriana	AZUMI et al., 2008
	Lipoamicoumacinas	<i>B. subtilis</i>	Antibacteriana	LIU et al., 2013
Pigmentos	Melanina	<i>B. thuringiensis</i>	Protetor UV	SANSINENEA, et al., 2015
Aminopoliol	Zwitermicina A	<i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i>	Antibactericida	KEVANY, et al., 2008; LUO et al., 2011
Alcalóides	3-Formilindol	<i>B. pumilus</i>	antitripassomal	MARTINEZ-LUIZ et al., 2012
	N-acetil-β-oxotripitamina	<i>B. pumilus</i>	antitripassomal	MARTINEZ-LUIZ et al., 2012
	3-Hidroxiacetilindoli	<i>B. pumilus</i>	antitripassomal	MARTINEZ-LUIZ et al., 2012



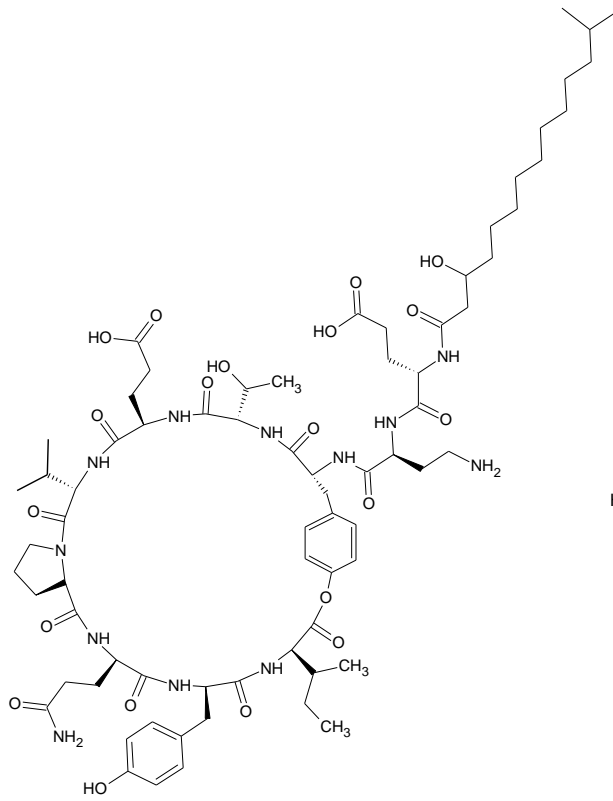
Bacitracina A
(B. subtilis, B. pumilus,
B. licheniformis)



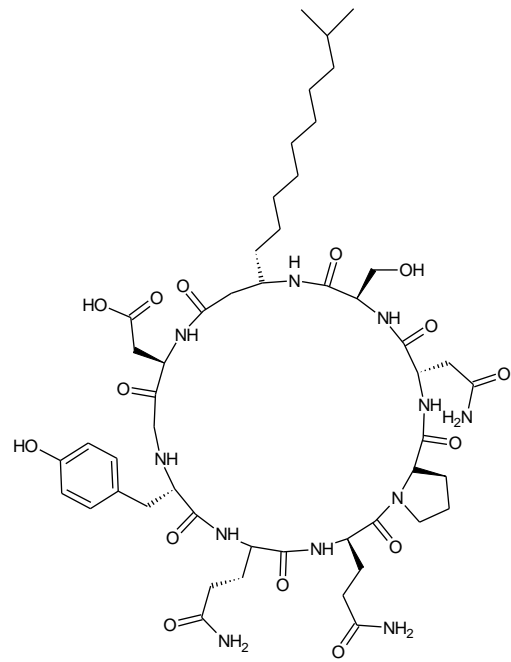
Tirocidina A
(B. brevis)



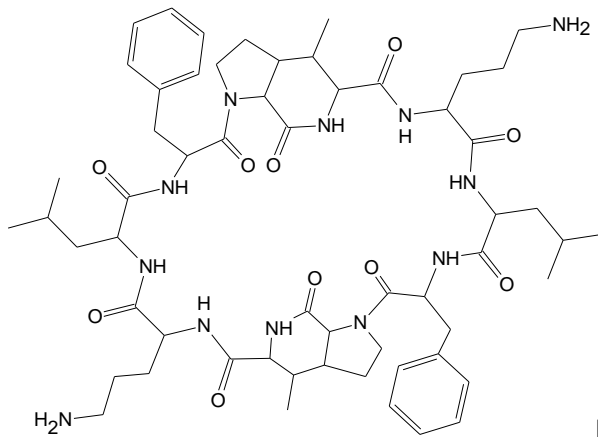
Surfactina B
(B. amyloliquefaciens, B. subtilis,
B. pumilus, B. licheniformis)



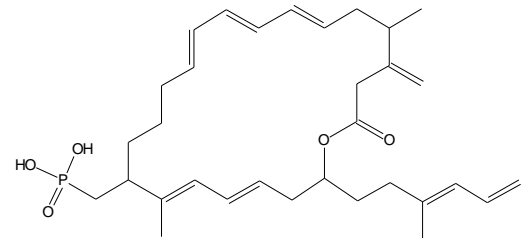
Fengicina B
(*B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*)



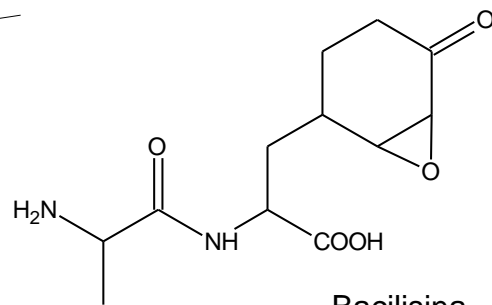
Iturina C
(*B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*)



Gramicidina
(*B. brevis*)



Difficidina
(*B. amyloliquefaciens*)



Bacilisina
(*B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*)

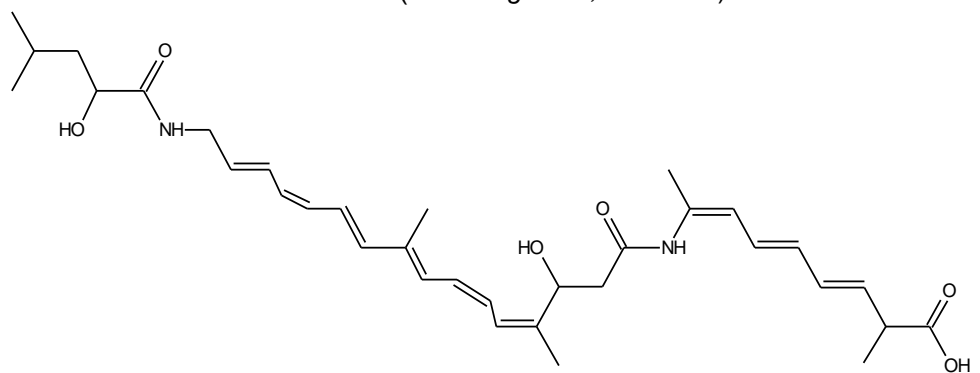
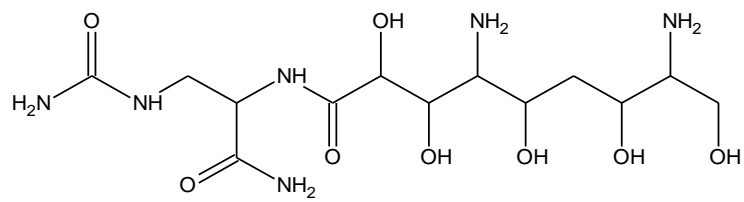
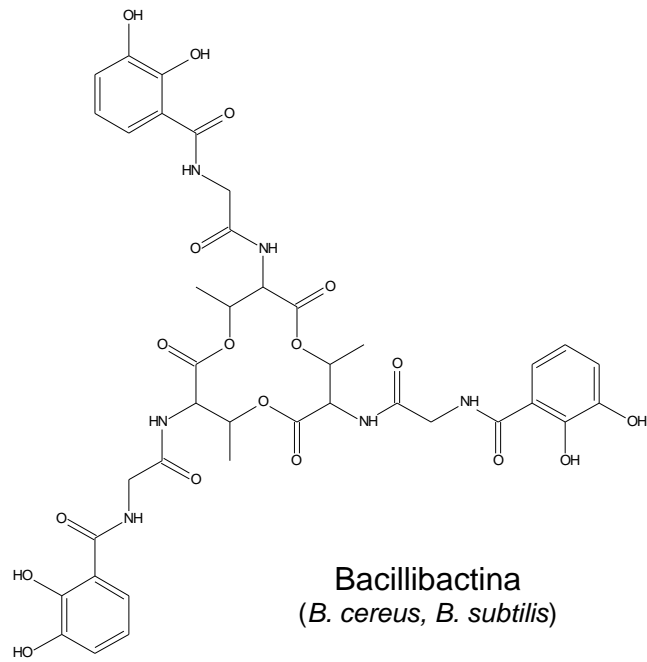
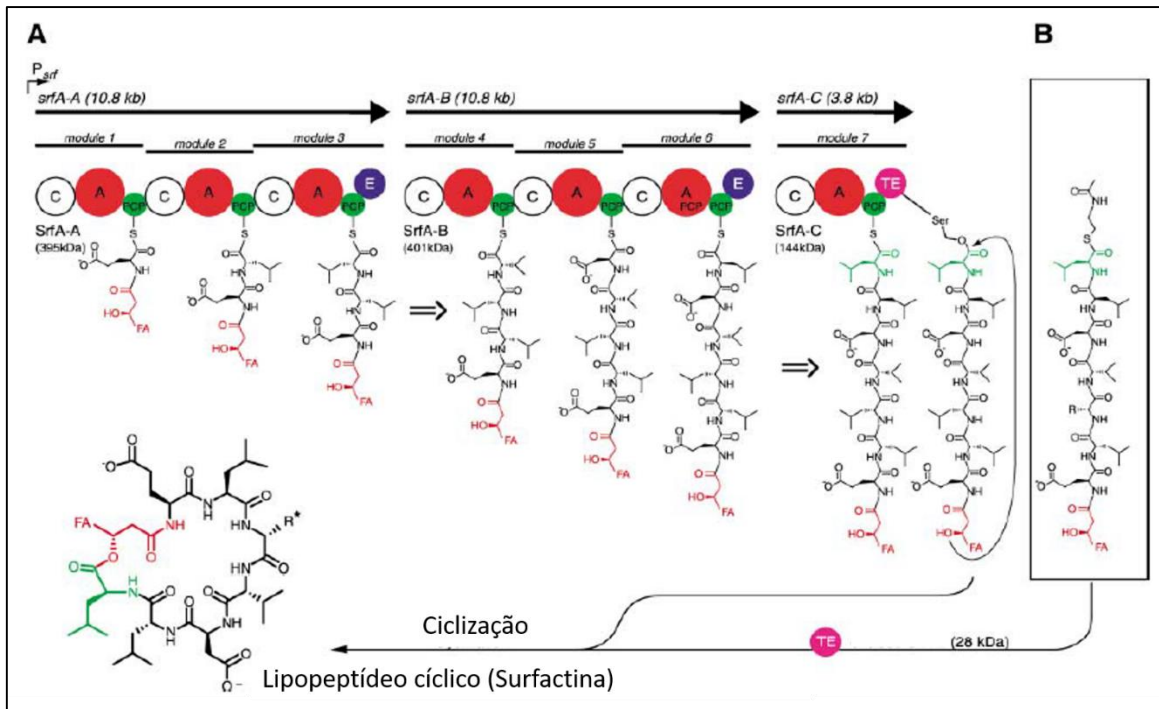


Figura 2. Metabólitos produzidos por espécies de *Bacillus*.

Muitas espécies de *Bacillus* possuem uma base genômica para a biossíntese de derivados de peptídeos policetídeos ou peptídeos não-ribossômicos devido à presença de grupos de enzimas policetílicas sintetases (PKSs) e peptídeo não-ribossomais sintetases (NRPSs).

As cadeias que formam a estrutura principal dos policetídeos são sintetizadas pelo grupo de enzimas PKSs. De forma similar os peptídeos não ribossomais são biossintetizados pelas NRPSs que, ao contrário dos ribossomos, são independentes do RNA mensageiro. Peptídeos não ribossomais possuem, muitas vezes, estruturas cíclicas e/ou ramificadas e lineares e podem conter aminoácidos não proteinogênicos (incluindo D-aminoácidos) e modificações estruturais como N-metilações, ou serem glicosilados, acilados, halogenados ou hidroxilados. A habilidade destes complexos multienzimáticos de incluir tais aminoácidos e incorporá-los em ambos os peptídeos cíclicos e lineares resulta em diversas estruturas naturais das espécies bacterianas e fúngicas. A complexidade estrutural dos NRPSs reflete seu largo espectro de atividades. Exemplificando, 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 7 módulos (Figura 4). Os genes NRPSs correspondentes são organizados no operon srfA. A via NRPSs envolve principalmente três domínios enzimáticos. O domínio de adenilação (A) seleciona o aminoácido cognato e o ativa como aminoacila adenilato. O aminoácido ativado é então transferido para uma proteína carreadora de peptidila (PCP) que o transfere ao domínio de condensação (C) que, finalmente, catalisa a formação da ligação peptídica.



(A) O operon *srf* (topo) com os três genes *srfA-A*, *srfA-B* e *srfA-C* que codificam para as subunidades da surfactina sintetase mostradas abaixo dos genes. As barras indicam as posições dos módulos dentro da proteína, enquanto os domínios individuais são mostrados como bolas coloridas: A, domínio de adenilação; PCP, domínio de proteína transportadora de peptidil; C, domínio de condensação; E, domínio de epimerização; TE, domínio tioesterase. O 4-fosfopantetoinil cofatores com seus grupos tiol ativos são mostrados com os peptídeos correspondentes anexados em seus estados de síntese atuais. O crescimento da cadeia peptídica é passado da esquerda para a direita, até que o produto linear no último domínio PCP seja ciclizado no lipopeptídeo pelo domínio TE. (B) O imitador do peptídeo SNAC (S-N-acetil cisteamina) acil pode ser ciclizado pelo domínio SrfTE geneticamente excisado. Fonte: BRUNER et al., 2002.

Figura 3. Exemplificação da biossíntese do lipopeptídeo surfactina por NRPSs.

Estes peptídeos não-ribossômicos produzidos por NRPSs representam um grupo de produtos naturais com grande importância farmacêutica, sintetizado não apenas por microrganismos do gênero *Bacillus*, mas por 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 (FIRA et al., 2018; CHANDRAKAR et al., 2018).

3.2.2 *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens foi descrito pela primeira vez em 1943 como um potente produtor de amilase e outras enzimas extracelulares de importância industrial (FUKUMOTO, 1943). Ele foi classificado no grupo "*B. subtilis*", que é

heterogêneo e envolve um grupo de espécies intimamente relacionadas, como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* e *B. pumilus* (LOGAN & BERKELEY, 1984). Em 1987, *B. amyloliquefaciens* foi reclassificado como uma espécie distinta com base na baixa relação de DNA com *B. subtilis* (PRIEST et al., 1987). Seu nicho ecológico é a rizosfera, onde coloniza as plantas, com benefício mútuo.



Fonte: autor

Figura 4. Cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* e imagem ampliada de suas estruturas reprodutivas.

B. amyloliquefaciens pode produzir vários metabólitos bioativos, geralmente antimicrobianos (Tabela 1), sendo reconhecida como um dos maiores produtores de lipopeptídeos surfactina, iturina e fengicina, (ONGENA & JACQUES, 2008; CHOWDHURY et al., 2013). Além disso, recentemente foi verificado que eles são também produtores de biofilmes (HUI et al., 2018), sideróforos (SABATÉ et al., 2018), enzima nariginase (ZHU et al., 2017) e hormônios (SHAHZAD et al., 2016; SABATÉ et al., 2018).

3.3 Lipopeptídeos produzidos por bactérias

Os lipopeptídeos (LPs) constituem um grupo estruturalmente diverso de metabólitos secundários e estão entre as classes mais importantes de substâncias produzidas por bactérias endofíticas, a partir de NRPSs ou PKSs (AYED et al., 2017).

São moléculas anfífilas microbianas valiosas com propriedades biológicas e tensoativas. Os lipopeptídeos mais estudados são os produzidos pelos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (ABDERRAHMANI et al., 2011; ROONGSAWANG et al., 2011). Eles têm aplicações importantes devido à atividade antibacteriana,

antifúngica e antiviral. Os lipopeptídeos possuem uma diversidade estrutural com base em uma cadeia acil de ácidos graxos hidrofóbicos de 13 a 17 átomos de carbonos, ligada a um peptídeo hidrofílico de 7 a 25 aminoácidos. A maioria destes possuem estrutura cíclica devido à ligação do resíduo peptídico C-terminal ao ácido graxo β -hidroxi através do grupo hidroxil do resíduo peptídico ou diretamente a um β -aminoácido (ROONGSAWANG et al., 2011). Uma única linhagem bacteriana pode sintetizar várias isoformas polipeptídicas.

As propriedades bioativas dos LPs podem levar a aplicações em diversas áreas da indústria. Na indústria farmacêutica e na agricultura, por exemplo, os lipopeptídeos têm recebido grande atenção por suas atividades antimicrobianas. (ONGENA & JACQUES, 2008; FIRA et al., 2018). Várias espécies de *Bacillus*, especialmente *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus* produzem substâncias antimicrobianas sendo os lipopeptídeos os principais responsáveis por essa atividade (DIMKIC et al., 2013, 2017; CHOWDHURY et al., 2015; AGARWAL et al., 2017). Estas moléculas também podem atuar sinergicamente com seu hospedeiro e, assim, aumentar sua atividade antimicrobiana, fato que possui algumas vantagens ecológicas e estimula o uso de cepas produtoras no controle biológico de fitopatógenos (FALARDEAU et al., 2013; LIU et al., 2014; NIKOLIC et al., 2018; SABIR et al., 2017; WICAK-SONO et al., 2018).

Os LPs também são úteis em aplicações ambientais como a remediação biológica de hidrocarbonetos de petróleo (MULLIGAN et al., 2005), na produção de alimentos, utilizados especialmente como emulsificantes, espumantes, umectantes e solubilizantes (BANAT et al., 2000).

A daptomicina (Cubicin[®]) produzida pela bactéria Gram-positiva *Streptomyces roseoporous* (MIAO et al., 2005) é um lipopeptídeo compreendendo uma cadeia lipídica decanoil ligada a um peptídeo de 13 aminoácidos parcialmente ciclizado com propriedades antimicrobianas potentes (Figura 5). Ela incorpora dois aminoácidos não-proteinogênicos: L-quinurenina (Kyn), exclusivo da daptomicina e ácido L-3-metilglutâmico (MeGlu).

A daptomicina é clinicamente aprovada para uso como antibiótico para infecções graves causadas por bactérias Gram-positivas, como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e *enterococos* resistentes à vancomicina (MIAO et al., 2005; NGUYEN et al., 2006; SADER et al., 2011).

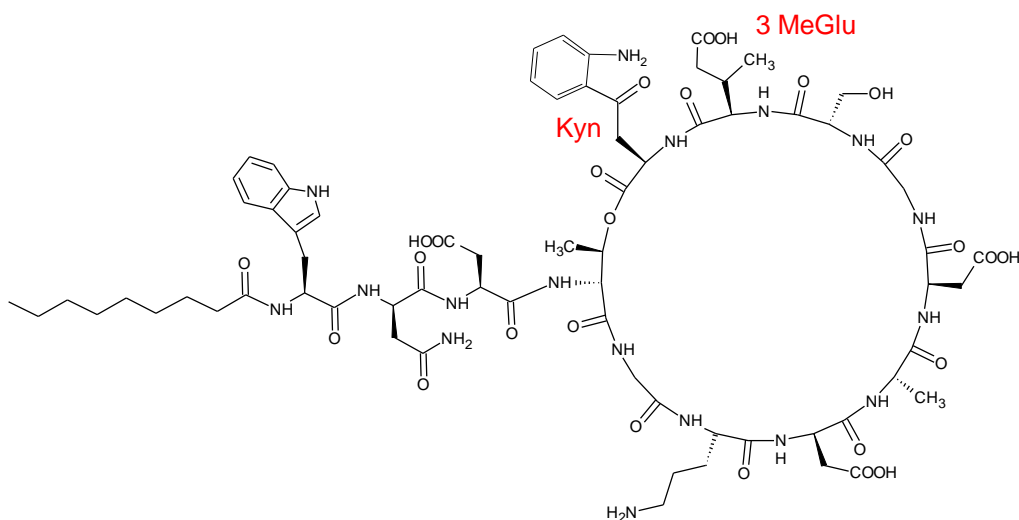
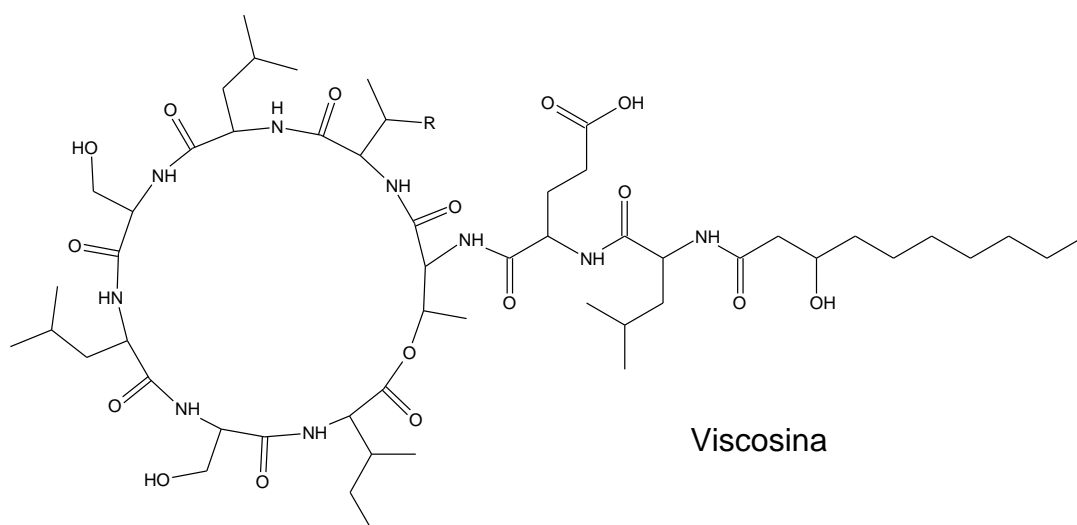


Figura 5. Lipopeptídeo Daptomicina produzido por *Streptomyces roseoporus*.

Os lipopeptídeos de *Pseudomonas* exibem uma variedade de propriedades antagônicas, como atividade antifúngica (NIELSEN et al., 1999), antibiótica (SINNAEVE et al., 2009), inseticida (RAAIJMAKERS et al., 2010) e antimicrobiano contra *Mycobacterium tuberculosis* causador da tuberculose (GROUPE et al., 1951). Viscosina, siryngomicina (Figura 6) e anfisina são os principais grupos de substâncias lipopeptídicas cíclicas produzidas por espécies de *Pseudomonas* (RAAIJMAKERS et al., 2006; GEUDENS et al., 2017).



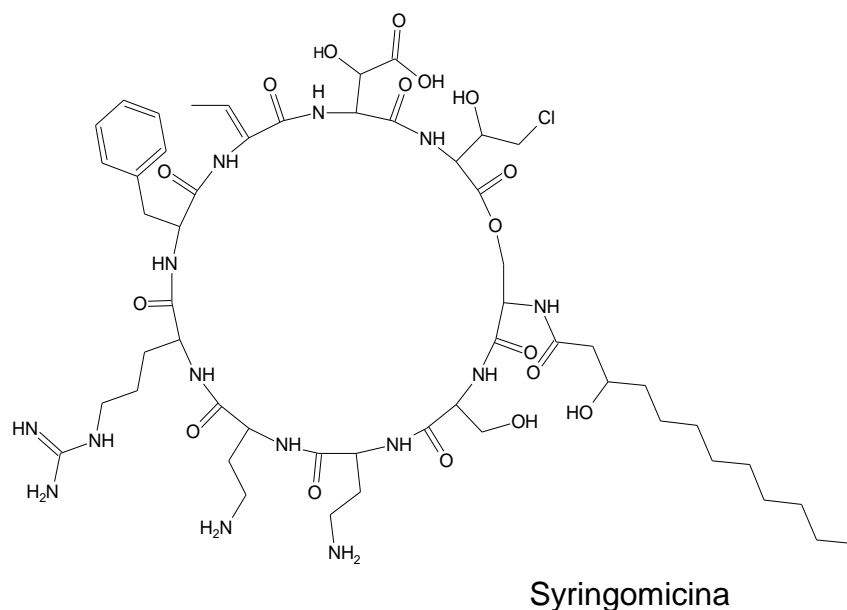
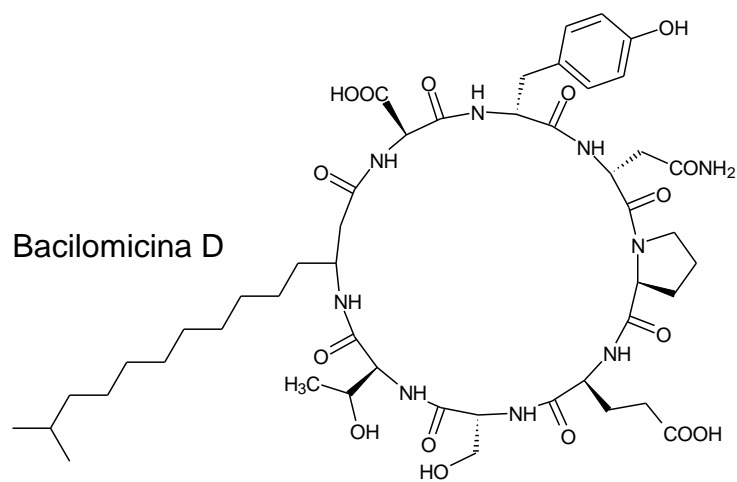
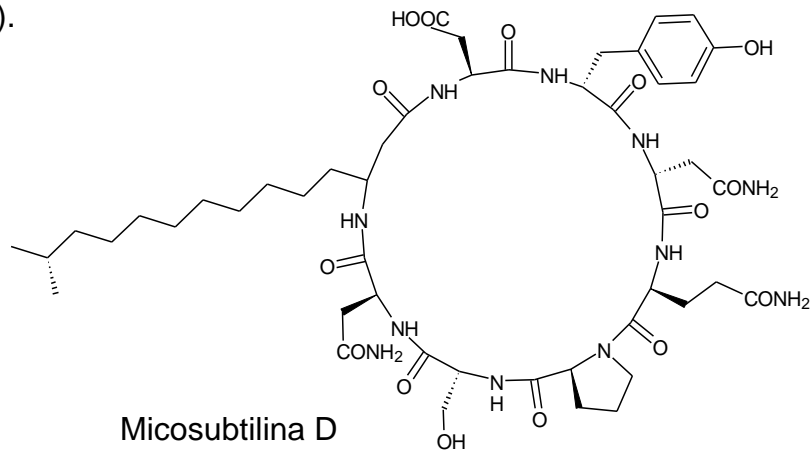


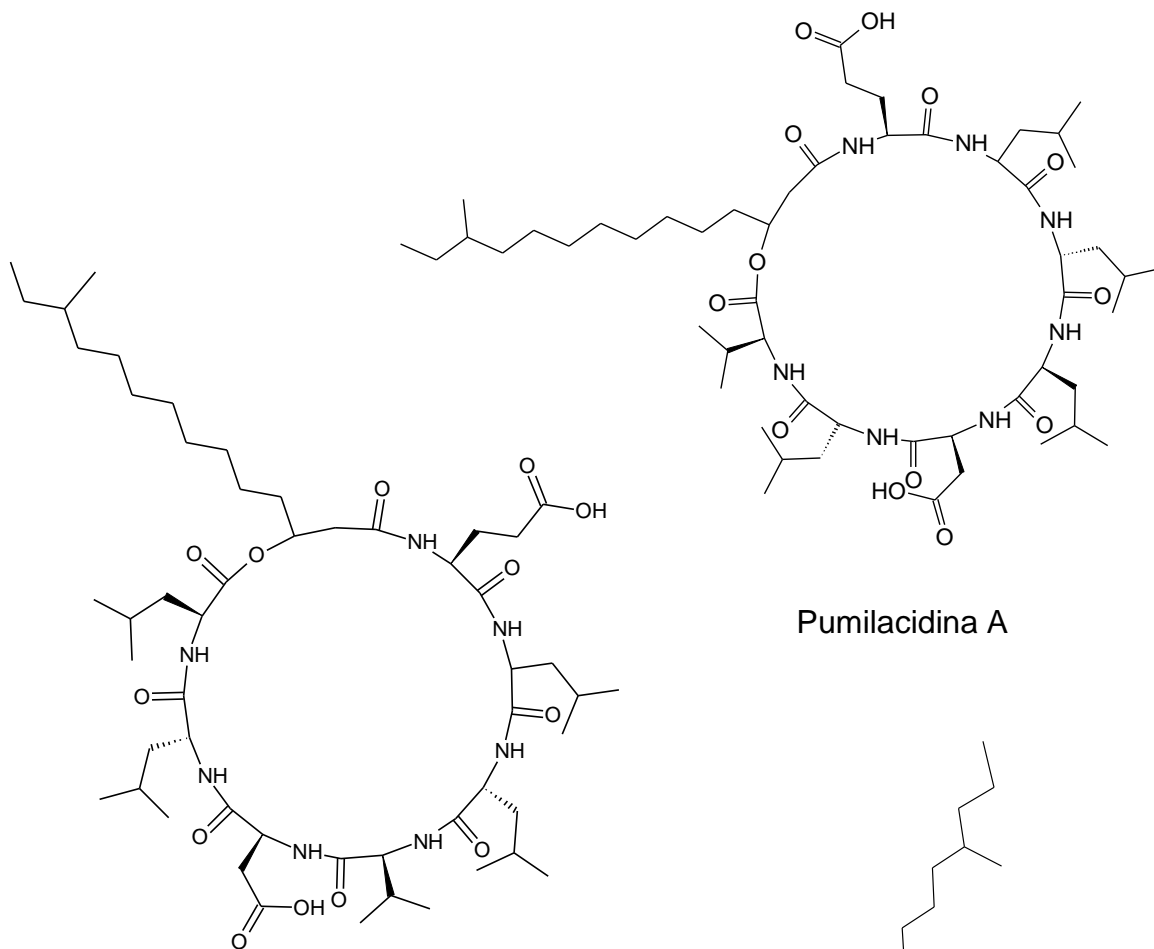
Figura 6. Principais lipopeptídeos produzidos por espécies de *Pseudomonas*.

Entre os lipopeptídeos sintetizados por NRPSs os mais estudados são os produzidos por *Bacillus*, sendo: bacilomicina, iturina, micosubtilina, fengicina, pumilacidina, lichenisina e surfactina (Figura 7) (STEIN, 2005; ONGENA & JCQUES, 2008; GRADY et al., 2016; VILLARREAL-DELGADO et al., 2018).

As lichenisinas, pumilacidinas e polimixina A e B são famílias de lipopeptídeos antimicrobianos produzidos principalmente por *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus polymyxa*, respectivamente. Lichenisina A possui atividades antimicrobiana e surfactante (YAKIMOV et al., 1995; GRANGEMARD et al., 2001), enquanto que várias pumilacidinas apresentam atividade anti-úlceras, antimicrobiana e antiviral contra o vírus herpes simplex (NARUSE et al., 1990; XIU et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2020). E além disso, recentemente foi demonstrado que as pumilacidinas A e C inibem o crescimento de parasitas da malária *in vitro*. (TORRES-MENDONZA, et al., 2018). A polimixina B e a polimixina E (colistina) são antibióticos utilizados contra uma grande variedade de bactérias Gram-negativas (LANDMAN et al., 2008; TRIMBLE et al., 2016). Estes dois lipopeptídeos são diferenciados pela substituição de uma D-leucina na colistina por uma D-fenilalanina na polimixina B (KWA et al., 2007). Dentre estas substâncias lipopeptídicas bioativas, as mais estudadas são as produzidas por *Bacillus*, sobretudo as surfactinas, fengicinas e iturinas (INÊS e

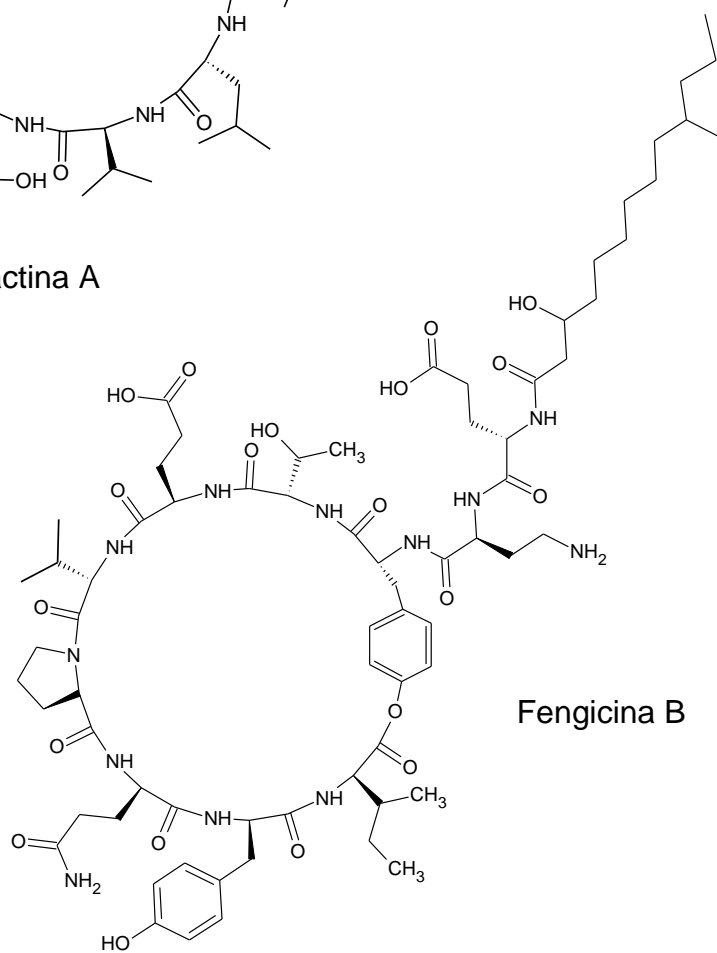
DHOUHA, 2015; ROONGSAWANG et al., 2011). Esta capacidade das espécies de *Bacillus* de produzirem muitos lipopeptídeos com atividades biológicas, as tornam promissoras para aplicações biotecnológicas (COCHRANE & VEDERAS, 2016).



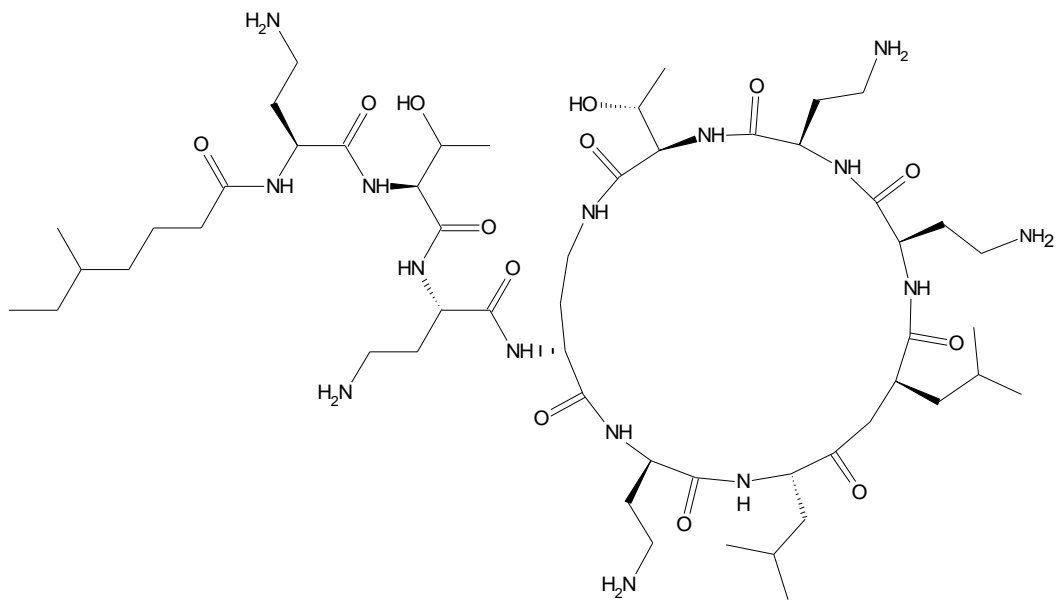


Surfactina A

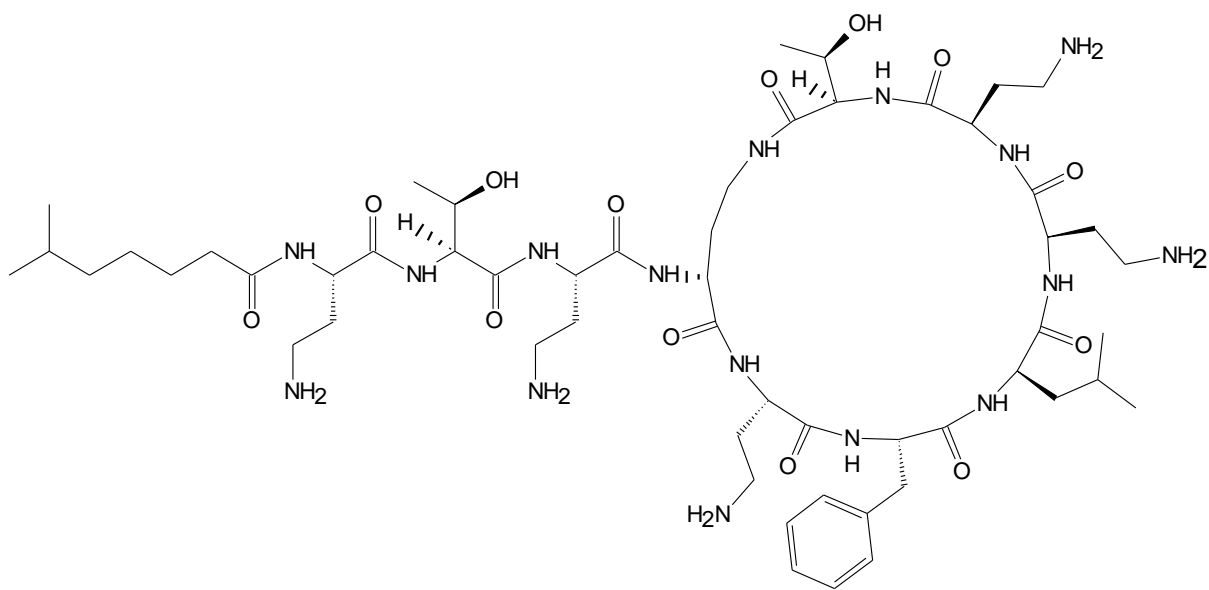
Pumilacidina A



Fengicina B



Polimixina E



Polimixina B

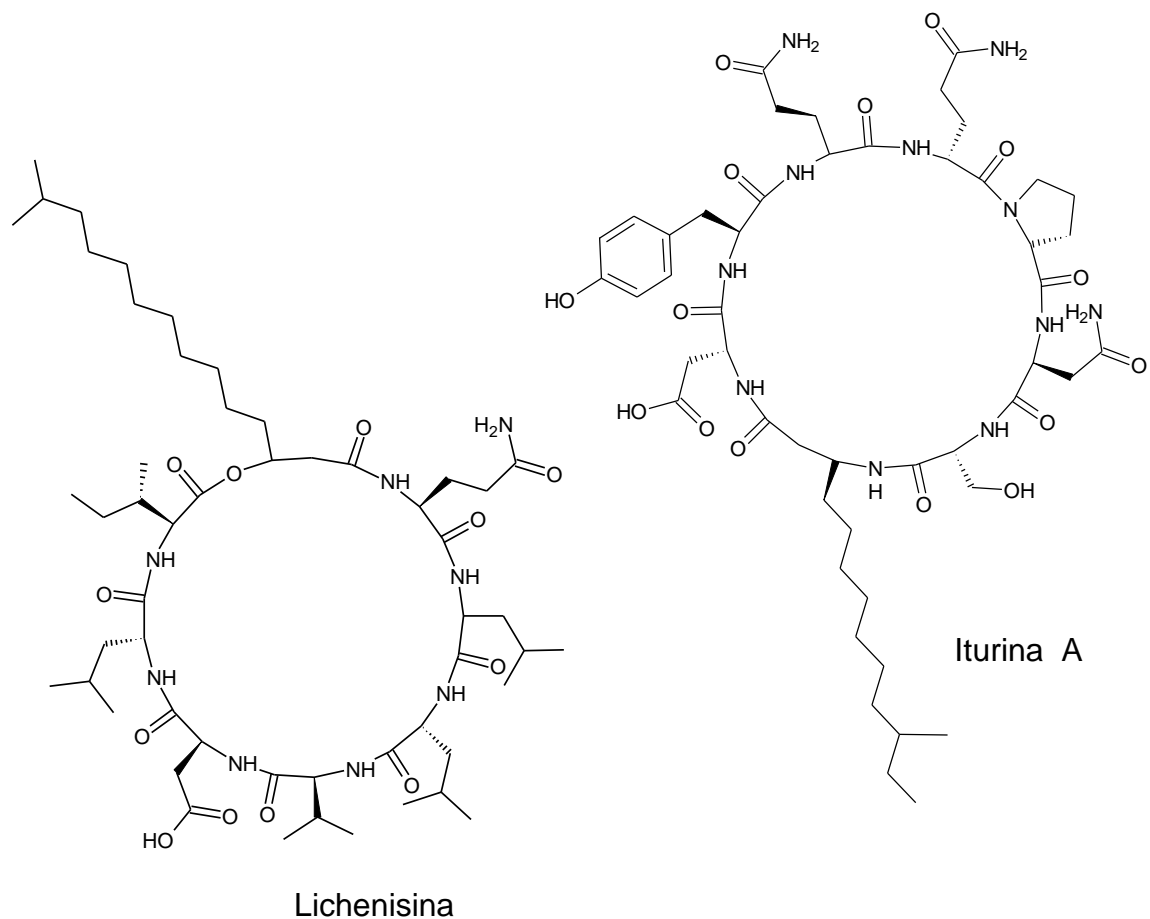


Figura 7. Lipopeptídeos produzidos por espécies de *Bacillus*.

3.3.1 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 meio fermentado de *B. subtilis*. O nome surfactina surgiu devido a sua alta capacidade surfactante, e a sua estrutura foi elucidada como um lipopeptídeo macrolídeo cíclico em que um ácido graxo β -hidroxilado está ligado a uma sequência de sete amino ácidos por um grupo amida e uma ligação lactona (PEYPOUX, 1999).

A família da surfactina é constituída de uma mistura de isoformas, cuja diferenciação ocorre devido a substituição nos resíduos de aminoácido na cadeia peptídica ou pelo comprimento e ramificação do ácido graxo (KOWALL et al., 1998).

O grupo da surfactina inclui principalmente 12 isoformas (Tabela 2) representadas por esperina, lichenisina, pumilacidina e surfactina. A principal isoforma, surfactina A (Leu⁷ – 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-hidroxi denominado ácido 3-hidróxi-13-metil-tetradecanóico (Figura 8) (VATER et al., 2002; LIU et al., 2008). Os isômeros diferem-se através do número de carbono na cadeia lipídica, 12 a 16, dos tipos de cadeia: *n*, *iso* e *anteiso*, ou 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) 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 (asparagina e glutamina) e cinco resíduos hidrofóbicos (quatro leucinas e uma valina) com sequência quiral LLDLLDL (Tabela 2).

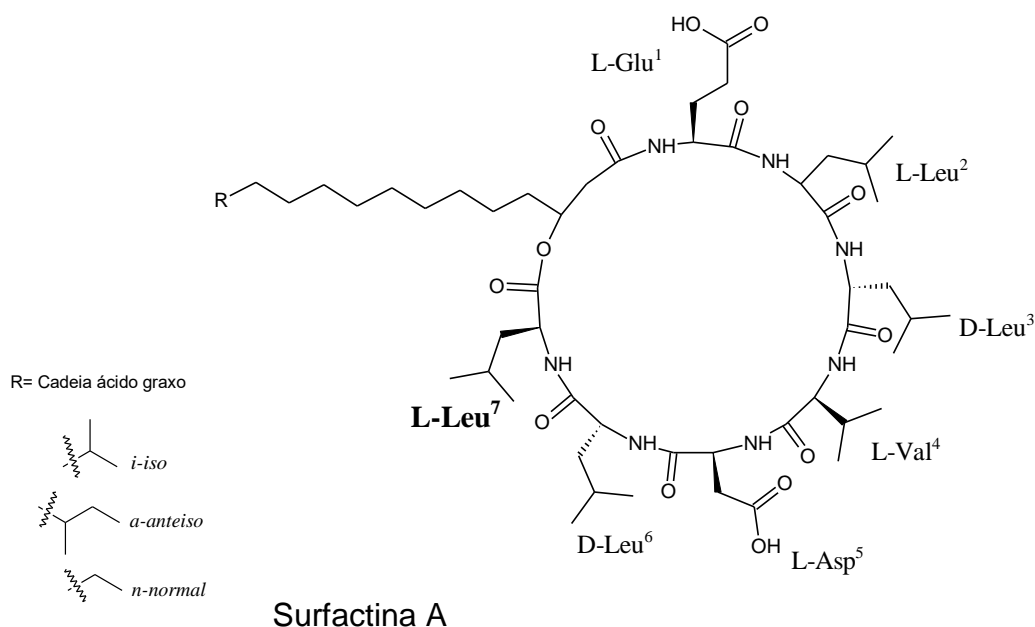
Surfactina ou variantes estreitamente relacionadas como lichenisina foram isolados a partir de *B. subtilis* (ARIMA et al., 1968), *B. coagulans* (HUSZCZA & BURCZYK, 2006), *B. pumilus* e *B. licheniformis* (PEYPOUX et al., 1999), *B. amyloliquefaciens* (NANJUNDAN et al., 2011) e *B. mojavensis* (BACON et al., 2012).

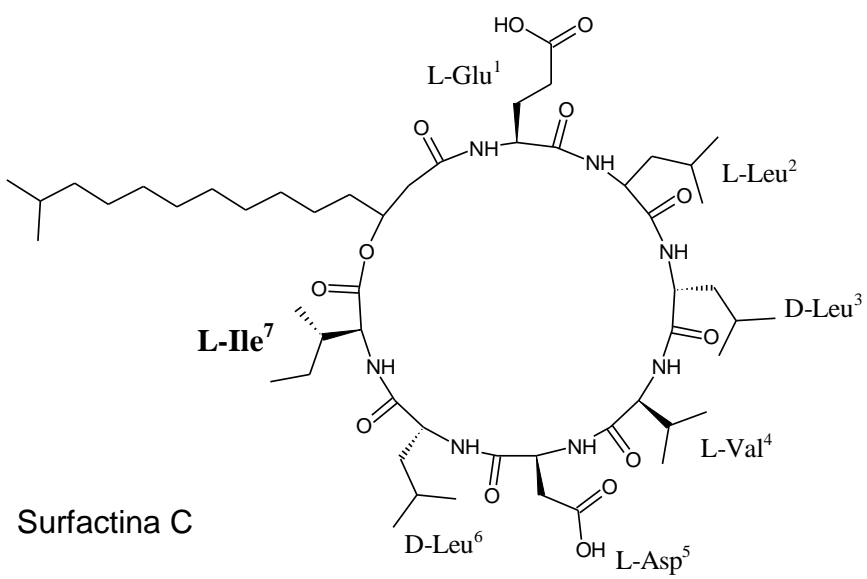
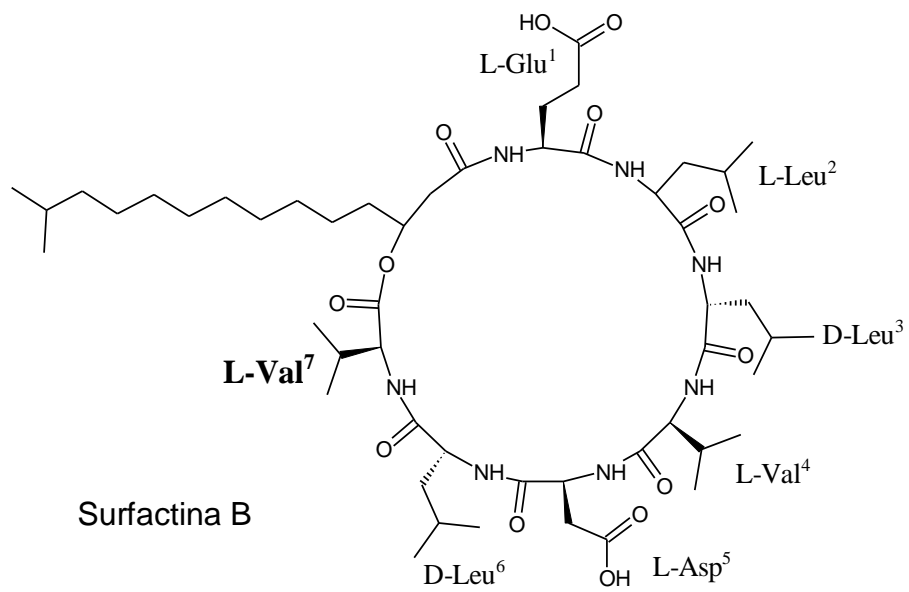
A surfactina é um dos biossurfactantes mais eficientes, conhecida por possuir excelentes propriedades tensoativas (BARROS et al., 2007) capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27,9 mN m⁻¹ (ARIMA et al., 1968). Surfactinas também apresentam grande estabilidade em variações de pH, temperatura, força iônica (DESAI & BANAT, 1997; KRACHT et al., 1999) e menores valores de concentração micelar crítica (CMC) quando comparadas a outros biossurfactantes e alguns surfactantes sintéticos (COOPER et al., 1981; KIM et al., 1997). A surfactina possui ainda diversas funções biológicas incluindo atividade antibacteriana e antifúngica (VATER, 1986), anti-inflamatória (KIM et al., 1998), atividade hemolítica (DESAI & BANAT, 1997), hipocolesterolêmica e antitumoral (WICAKSONO, et al., 2018) atividade antiviral (VOLLENBROICH et al., 1997), antimicoplasma (MADAN et al., 2001), inibidora da formação de coágulos de fibrina (KIKUCHI & HASUMI, 2002), efeitos imunomodulatórios

(PARK & KIM, 2009) e veículo para administração de drogas via pulmonar (HUSSAIN et al., 2004).

A crescente descoberta de propriedades interessantes com aplicações nas áreas da medicina e biotecnologia promoveu o interesse em pesquisa pela surfactina e como resultado, uma grande variedade de isoformas e homólogos deste lipopeptídeo já foram encontrados. Essas funções caracterizam a surfactina como molécula biologicamente ativa. Embora outros lipopeptídeos tenham surgido, a surfactina continua a ser o principal representante e mais conhecido membro desta família (PEYPOUX, 1999).

Esta substância mostrou também atividade antitumoral contra células com carcinoma de Ehrlich, atividade antiproliferativa em experimentos com células dos cânceres de ovário, renal, de próstata, de cólon, de pulmão, de mama e melanoma bem como atividade citostática e citotóxica a todos os carcinomas investigados, estudos propõem que a ação anticarcinogênica da surfactina deve-se a ruptura da membrana plasmática ao atingir o interior da célula (COSTA, 2005; SIVAPATHASEKARAN et al., 2010; MOREJON, et al., 2017; ABDELLI, et al., 2019; RAMALINGAN, et al., 2019).





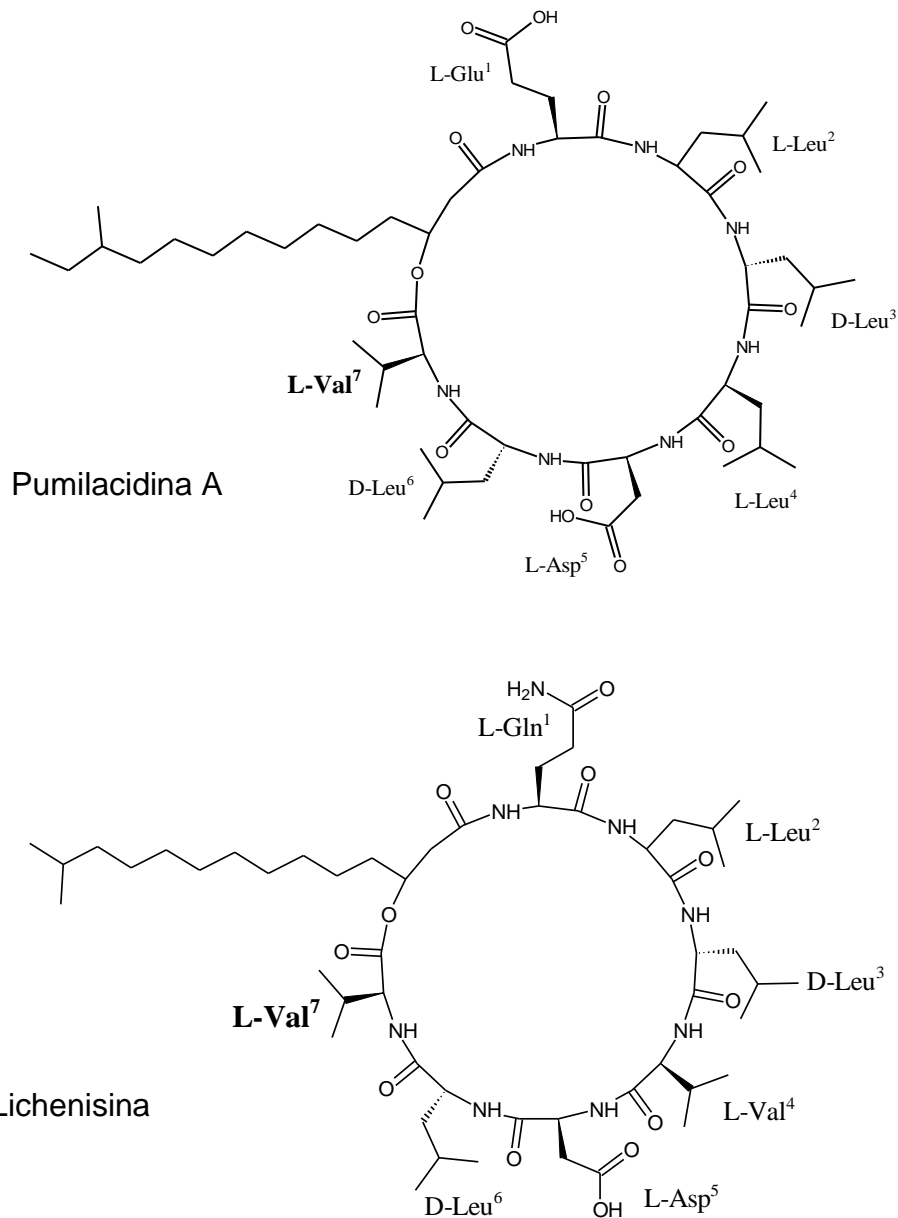


Figura 8. Lipopeptídeos da família da surfactina.

Os mecanismos de ação dos lipopeptídeos têm mostrado que estes formam poros na membrana lipídica, especificamente de fungos e bactérias, ocasionando o influxo de íons transmembrana incluindo Na^+ e K^+ , causando a destruição da membrana e conseqüentemente a morte celular (SCOTT et al., 2007). No caso da surfactina, apesar dos mecanismos de ação não estarem plenamente elucidados, presume-se que ocorra uma interação direta da surfactina com os fosfolipídeos da membrana celular com a conseqüente alteração das propriedades da estabilidade da bicamada lipídica (CARRILLO et al., 2003; HUSSAIN et al., 2004). Estudos

sobre os mecanismos moleculares de permeabilização de membrana através da incorporação da surfactina demonstraram haver perda do conteúdo vesicular através da desestabilização lipídica ou formação de poros intra-membranais (SHEPPARD et al., 1991). A surfactina forma *clusters* com os fosfolípídeos, estabelecendo domínios de surfactina dentro da bicamada (GRAU et al., 1999). Esta molécula pode ainda formar, nas bicamadas, agregados micelares com organização lamelar ou pequenas vesículas fechadas, que solubilizam a membrana biológica, atuando como um detergente nesta estrutura (GRAU et al., 1999; CARRILLO et al., 2003).

Tabela 2. Família da Surfactina.

FAMÍLIA DA SURFACTINA	SEQUÊNCIA PEPTÍDICA	CADEIAS DE ÁCIDOS GRAXOS	REFERÊNCIAS
	Heptapeptídeos cíclico com um anel de lactona com o grupo β -OH ligado a cadeia de ácido graxo		
Surfactina A	L-Glu ¹ -L-Leu ² -D-Leu ³ -L-Val ⁴ -L-Asp ⁵ -D-Leu ⁶ -L-Leu ⁷	C ₁₂ , <i>i</i> -C ₁₃ , * <i>i</i> -C ₁₄ , * <i>n</i> -C ₁₄ , <i>i</i> -C ₁₅ , * <i>a</i> -C ₁₅ , C ₁₆	PEYPOUX et al., 1999; PECCI et al., 2010
Surfactina B	L-Glu ¹ -L-Leu ² -D-Leu ³ -L-Val ⁴ -L-Asp ⁵ -D-Leu ⁶ -L-Val ⁷	<i>i</i> -C ₁₄ , <i>n</i> -C ₁₄ , <i>i</i> -C ₁₅ , <i>a</i> -C ₁₅ , <i>i</i> -C ₁₄ , <i>n</i> -C ₁₄ , <i>i</i> -C ₁₅ , <i>a</i> -C ₁₅	PEYPOUX et al., 1999
Surfactina C	L-Glu ¹ -L-Leu ² -D-Leu ³ -L-Val ⁴ -L-Asp ⁵ -D-Leu ⁶ -L-Ile ⁷		PEYPOUX et al., 1999
[Ala ⁴] surfactina	L-Glu ¹ -L-Leu ² -D-Leu ³ -L-Ala ⁴ -L-Asp ⁵ -D-Leu ⁶ -L-Leu ⁷	<i>i</i> -C ₁₄ , <i>n</i> -C ₁₄ , <i>i</i> -C ₁₅ , <i>a</i> -C ₁₅	BONMATIN et al., 2003
[Leu ⁴] surfactina	L-Glu ¹ -L-Leu ² -D-Leu ³ -L-Leu ⁴ -L-Asp ⁵ -D-Leu ⁶ -L-Leu ⁷	<i>i</i> -C ₁₅	BONMATIN et al., 2003
[Ile ⁴] surfactina	L-Glu ¹ -L-Leu ² -D-Leu ³ -L-Ile ⁴ -L-Asp ⁵ -D-Leu ⁶ -L-Ile ⁷	<i>a</i> -C ₁₅	BONMATIN et al., 2003
Esperina ^b	L-Glu ¹ -L-Leu ² -D-Leu ³ -L-Val ⁴ -L-Asp ⁵ -D-Leu ⁶ -L-Leu/Val ⁷ -COOH	C ₁₃ , C ₁₄ , <i>n</i> -C ₁₅	THOMAS & ITO, 1969
[Val ⁷] Lichenisina	L-Gln ¹ -L-Leu/Ile ² -D-Leu ³ -L-Val ⁴ -L-Asp ⁵ -D-Leu ⁶ -L-Val ⁷	<i>i</i> -C ₁₃ , <i>a</i> -C ₁₃ , <i>n</i> -C ₁₄ , <i>i</i> -C ₁₅ , <i>a</i> -C ₁₅	BONMATIN et al., 2003; LIN et al., 1994
[Ile ⁴] Lichenisina	L-Gln ¹ -L-Leu ² -D-Leu ³ -L-Ile ⁴ -L-Asp ⁵ -D-Leu ⁶ -L-Ile ⁷	<i>a</i> -C ₁₅	BONMATIN et al., 2003; LIN et al., 1994
[Ile ^{2,4}] Lichenisina	L-Gln ¹ -L-Ile ² -D-Leu ³ -L-Ile ⁴ -L-Asp ⁵ -D-Leu ⁶ -L-Ile ⁷	<i>a</i> -C ₁₅	BONMATIN et al., 2003; LIN et al., 1994
Pumilacidina A	L-Glu ¹ -L-Leu ² -D-Leu ³ -L-Leu ⁴ -L-Asp ⁵ -D-Leu ⁶ -L-Val ⁷	<i>a</i> -C ₁₅ , <i>i</i> -C ₁₅ , <i>n</i> -C ₁₆ , <i>i</i> -C ₁₆ , <i>a</i> -C ₁₇ , <i>i</i> -C ₁₇	NARUSE et al., 1990; OLIVEIRA et al., 2020
Pumilacidina B	L-Glu ¹ -L-Leu ² -D-Leu ³ -L-Leu ⁴ -L-Asp ⁵ -D-Leu ⁶ -L-Ile ⁷	<i>i</i> -C ₁₃ , <i>a</i> -C ₁₄	OLIVEIRA et al., 2020

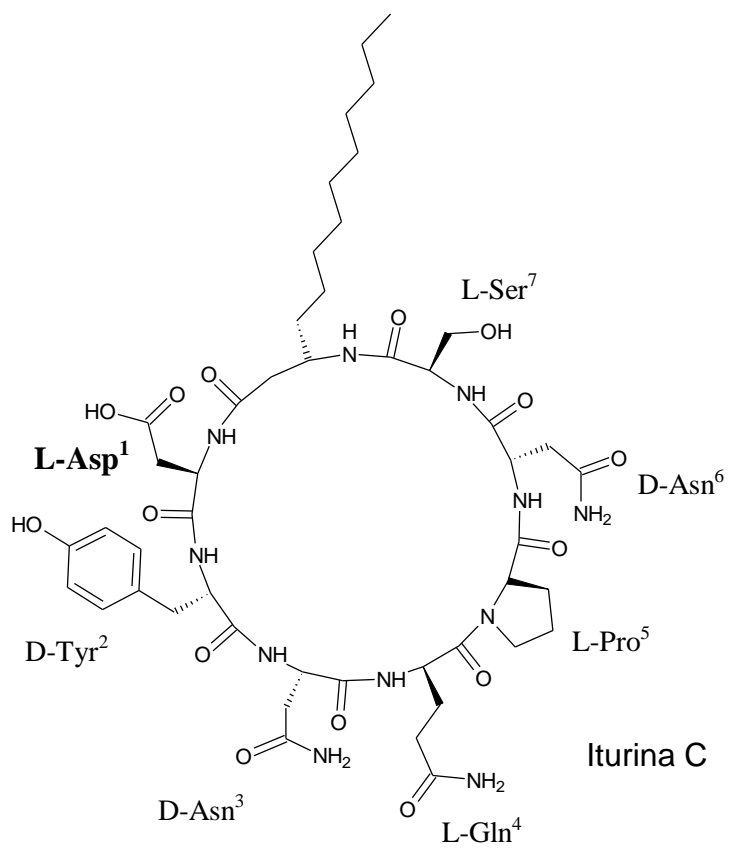
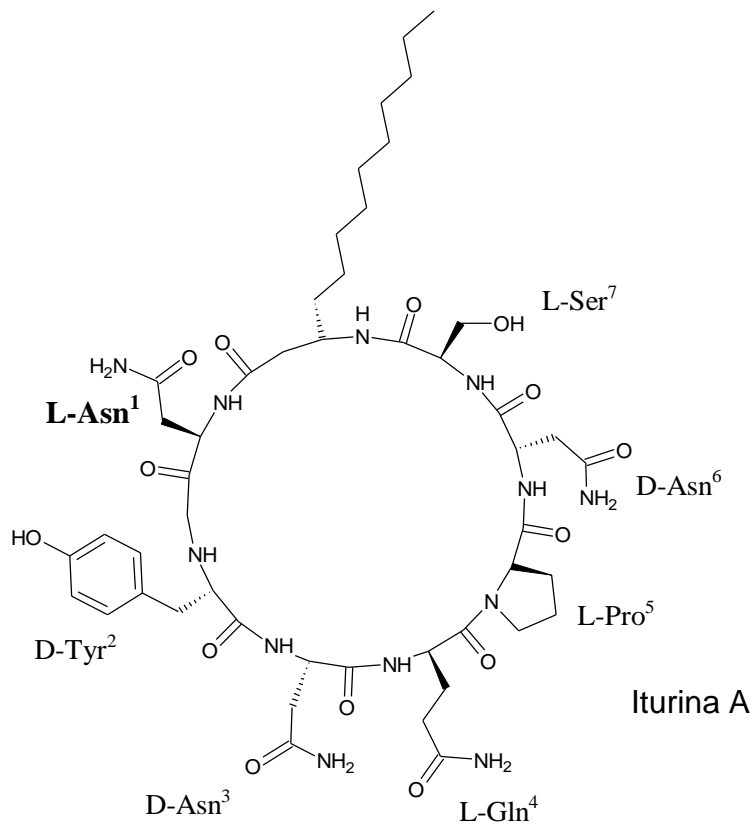
3.3.2 Família da Iturina

A iturina é um heptapeptídeo ligado a um ácido graxo cujo comprimento varia de 14 a 17 átomos de carbonos. Iturina A (Tabela 3) é o composto principal e mais conhecido da família da iturina, e foi isolada inicialmente de *B. 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 linhagens de *B. subtilis* levou a identificação de outros lipopeptídeos. Além da iturina A, a literatura tem reportado 6 isoformas de iturina (Tabela 3) que se diferenciam devido a substituição nos resíduos de aminoácido na cadeia peptídica ou pelo comprimento e ramificação da cadeia carbônica (BONMATIN, 2003; NORIYASU et al., 2009).

Tabela 3. Família da Iturina.

FAMÍLIA DAS ITUINAS	SEQUÊNCIA PEPTÍDICA							CADEIA DE ÁCIDO GRAXO
	L	D	D	L	L	D	L	
Iturina A	Asn ¹	Tyr ²	Asn ³	Gln ⁴	Pro ⁵	Asn ⁶	Ser ⁷	<i>n</i> -C ₁₄ , <i>i</i> -C ₁₅ , <i>a</i> -C ₁₅ , <i>n</i> -C ₁₆ , <i>i</i> -C ₁₆
Iturina C	Asp ¹	Tyr ²	Asn ³	Gln ⁴	Pro ⁵	Asn ⁶	Ser ⁷	<i>n</i> -C ₁₄ , <i>i</i> -C ₁₅ , <i>a</i> -C ₁₅
Mycosubtilina	Asn ¹	Tyr ²	Asn ³	Gln ⁴	Pro ⁵	Ser ⁶	Asn ⁷	<i>i</i> -C ₁₆ , <i>a</i> -C ₁₇
Bacillomicina D	Asn ¹	Tyr ²	Asn ³	Pro ⁴	Glu ⁵	Ser ⁶	Thr ⁷	<i>n</i> -C ₁₄ , <i>i</i> -C ₁₅ , <i>a</i> -C ₁₅
Bacillomicina F	Asn ¹	Tyr ²	Asn ³	Gln ⁴	Pro ⁵	Asn ⁶	Thr ⁷	<i>i</i> -C ₁₆ , <i>a</i> -C ₁₇ , <i>i</i> -C ₁₇
Bacillomicina L	Asp ¹	Tyr ²	Asn ³	Ser ⁴	Gln ⁵	Ser ⁶	Thr ⁷	<i>n</i> -C ₁₄ , <i>i</i> -C ₁₅ , <i>a</i> -C ₁₅
Bacillopeptina	Asn ¹	Tyr ²	Asn ³	Gln ⁴	Gln ⁵	Ser ⁶	Thr ⁷	<i>n</i> -C ₁₄ , <i>i</i> -C ₁₅

a-anteiso; *i*-iso; *n*-normal. Fonte: Adaptado de JACQUES, 2011 e GONG et al., 2015.



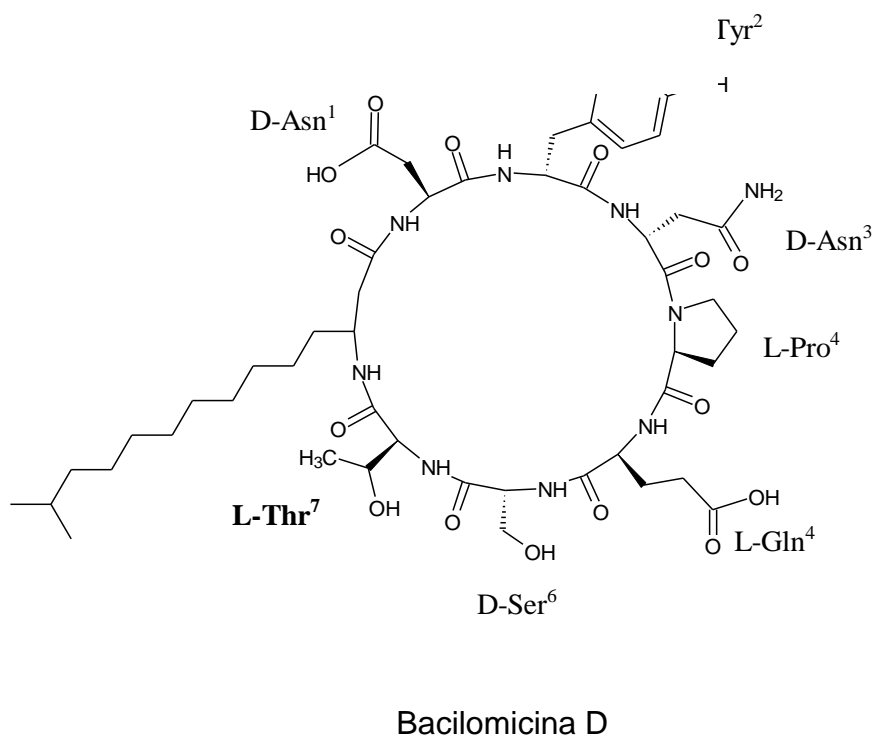
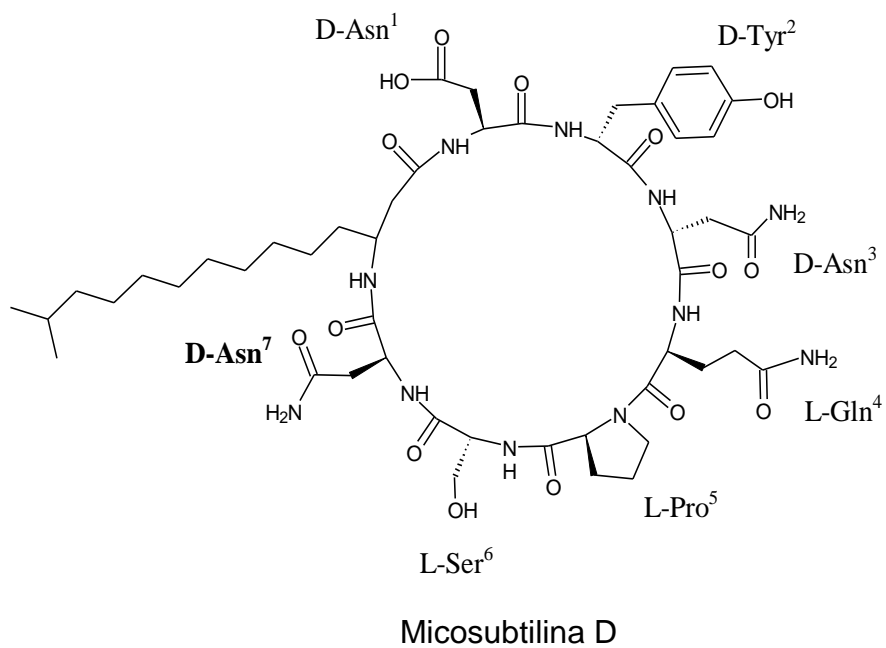


Figura 9. Lipopeptídeos da família da Iturina.

Iturina A é um lipopeptídeo cíclico contendo sete resíduos de α -aminoácidos e um resíduo de um β -aminoácido como cadeia lateral, sintetizado

de forma não ribossômica e com massa molecular nominal de 1042 Da (MAGET-DANA & PEYPOUX, 1994).

Iturina A demonstra uma atividade antifúngica com um espectro amplo de ação, o que a torna um agente de controle biológico potencialmente ideal com o objetivo de reduzir o uso de antifúngicos químicos na agricultura (MAGETDANA & PEYPOUX, 1994; YU et al., 2002; STEIN, 2005; ARREBOLA et al., 2010). De fato, a atividade antifúngica de *B. subtilis* pode ser atribuída, em grande parte, a produção de iturina A (ARREBOLA et al., 2010). Além disso, triagens clínicas em seres humanos e animais igualmente mostraram iturina A sendo uma droga valiosa devida seu amplo espectro antifúngico, baixa toxicidade, e baixo efeito alérgico (MAGETDANA & PEYPOUX, 1994; YAO et al., 2003; KIM et al., 2010). Estudos sobre seu mecanismo de ação mostram que a mesma se comporta como uma molécula anfifílica não iônica que tem como sítio alvo estruturas fosfolipídicas e esteróis. Desta forma, induz a abertura de canais iônicos nas membranas de células de fungos e leveduras, aumentando a permeabilidade e condutância a íons, o que causa um desequilíbrio eletroquímico entre os meios intra e extracelular (MAGET-DANA & PEYPOUX, 1994; GRAU et al., 2001; SINGH & CAMEOTRA, 2004; LIMA et al., 2020; SUCHODOISKI et al., 2020). Apesar de muitas vantagens sobre agentes químicos, a iturina A tem tido poucas aplicações, principalmente por causa da baixa produtividade e dos custos de produção relativamente elevados (SZCZECZ & SHODA, 2006; YU et al., 2002).

A produção de iturina parece ser restrita a *B. subtilis* (BONMATIN et al., 2003), *B. amyloliquefaciens* e *B. megaterium* (SUMI et al., 2015; KOUMOUTSI et al., 2004) e há relatos de atividade inibitória de crescimento contra diversas espécies de fungos incluindo *Fusarium oxysporum* (YUAN et al., 2012; XU et al., 2013) e *Fusarium gramineum* (GU et al., 2017).

3.3.3 Família da Fengicina

Essa família de lipopeptídeos compreende as fengicinas A e B e plipastatinas A e B (Figura 10).

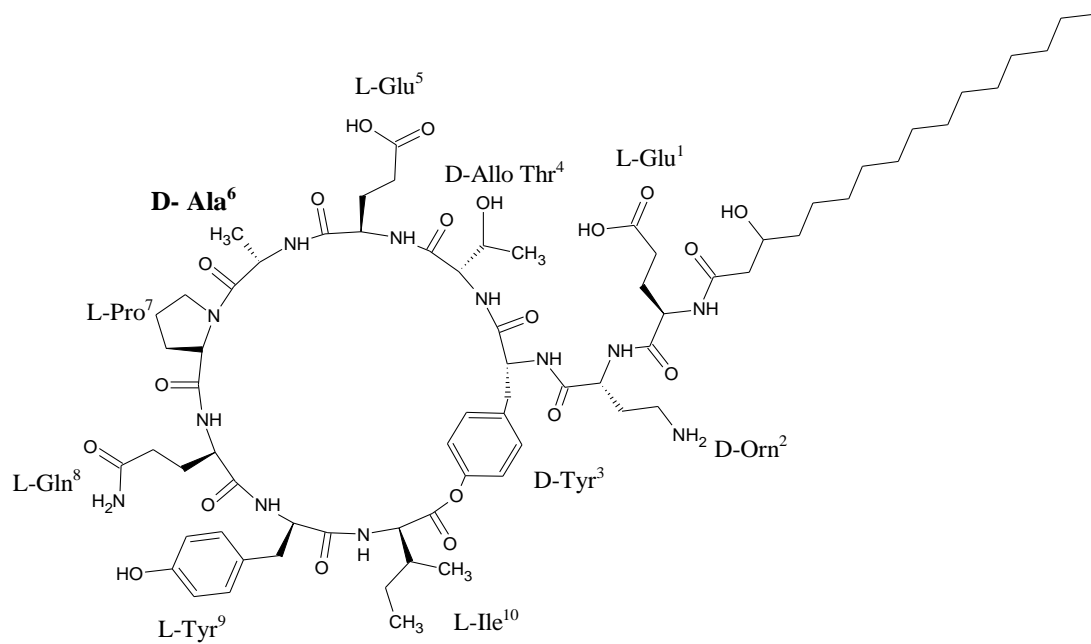
As fengicinas consistem de duas principais isoformas (Fengicina A e B) que se diferenciam pela substituição do resíduo de aminoácido D-Ala por D-Val, respectivamente, na posição 6 (Tabela 4). Em ambas as isoformas, há uma ligação lactona conectando Tyr³ a Ile¹⁰, cuja estrutura é composta por um ácido

graxo β -hidróxi ligado a uma porção peptídica de 10 aminoácidos, sendo 8 em ciclo (Figura 10). Esse ácido graxo pode variar de 14 a 18 átomos de carbono, distribuídos nas formas *n*, *iso* e *anteiso* (ROMERO et al., 2007; ONGENA et al., 2007; VANITTANAKOM et al., 1986; VATER et al., 2002; DAS, 2008; WANG et al., 2004). Fengicinas diferem de iturinas e de surfactinas pela presença de aminoácidos incomuns, tais como ornitina e alo-treonina. Fengicina inclui três resíduos de aminoácidos que podem ser protonados ou desprotonado de acordo com o pH. Em pH neutro, ela exibe duas cargas negativas (resíduos de ácido glutâmico) e uma carga positiva (resíduo ornitina), que deverão afetar sua conformação e desempenhar um papel importante nas suas interações intermoleculares (EEMAN et al., 2009).

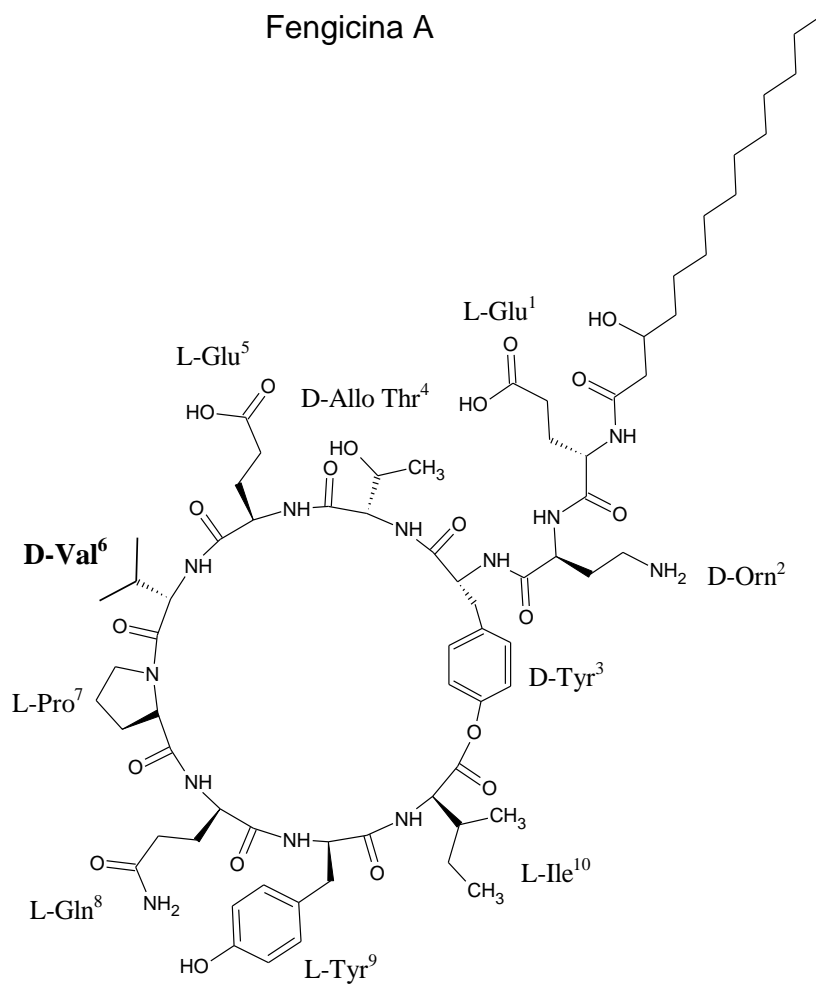
Tabela 4. Família da Fengicina.

FAMILIA DA FENGICINA	SEQUÊNCIA PEPTÍDICA		REFERÊNCIAS
	Decapeptídio com um anel de lactona entre o grupo carboxi-terminal de Ile ¹⁰ e grupo OH de Tyr ³ .	CADEIA DE ÁCIDO GRAXO	
Fengicina A	L-Glu ¹ -D-Orn ² -D-Tyr ³ -D-Thr ⁴ -L-Glu ⁵ -D-Ala ⁶ -L-Pro ⁷ -L-Gln ⁸ -L-Tyr ⁹ -L-Ile ¹⁰	<i>a</i> -C ₁₅ , <i>i</i> -C ₁₆ , <i>n</i> -C ₁₆	JACQUES, 2011
Fengicina B	L-Glu ¹ -D-Orn ² -D-Tyr ³ -D-Thr ⁴ -L-Glu ⁵ -D-Val ⁶ -L-Pro ⁷ -L-Gln ⁸ -L-Tyr ⁹ -L-Ile ¹⁰	<i>a</i> -C ₁₅ , <i>i</i> -C ₁₆ , <i>n</i> -C ₁₆ , C ₁₇	JACQUES, 2011
Plipastatina A	L-Glu ¹ -D-Orn ² -L-Tyr ³ -D-Thr ⁴ -L-Glu ⁵ -D-Ala ⁶ -L-Pro ⁷ -L-Gln ⁸ -D-Tyr ⁹ -L-Ile ¹⁰	<i>n</i> -C ₁₆ , <i>a</i> -C ₁₇	NISHIKIORI et al., 1986; JACQUES, 2011
Plipastatina B	L-Glu ¹ -D-Orn ² -L-Tyr ³ -D-Thr ⁴ -L-Glu ⁵ -D-Val ⁶ -L-Pro ⁷ -L-Gln ⁸ -D-Tyr ⁹ -L-Ile ¹⁰	<i>n</i> -C ₁₆ , <i>a</i> -C ₁₇	NISHIKIORI et al., 1986; JACQUES, 2011

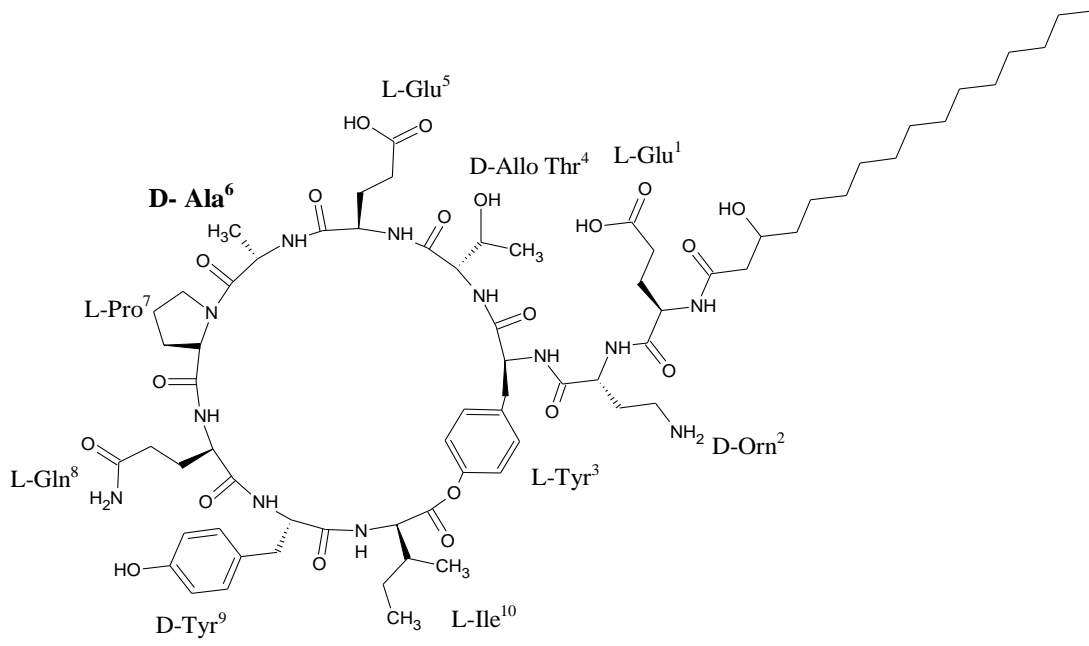
a-anteiso; *i*-iso; *n*-normal



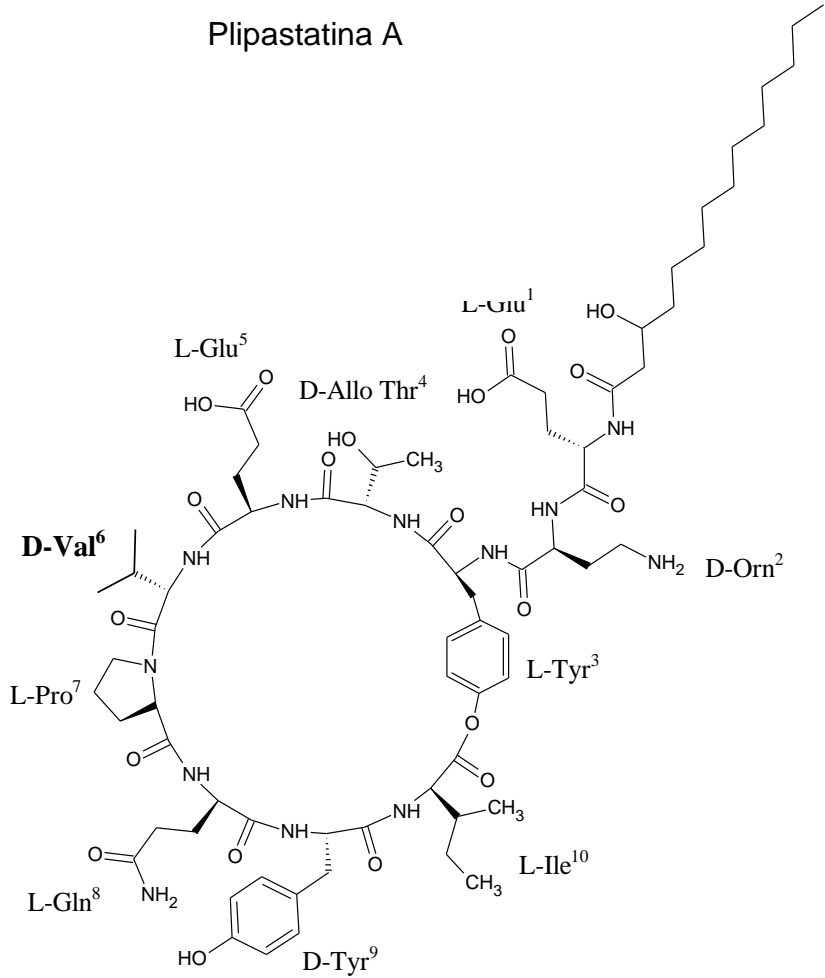
Fengicina A



Fengicina B



Plipastatina A



Plipastatina B

Figura 10. Lipopeptídeos da família da fengicina.

Alguns trabalhos revelam que as fengicinas são menos hemolíticas que iturinas e surfactinas, as quais mantêm uma forte atividade antifúngica, especificamente contra fungos filamentosos (VANITTANAKOM et al., 1986; KOUMOUTSI et al., 2004), mas é ineficaz frente a bactérias e leveduras (ROMERO et al., 2007; ONGENA et al., 2007; VANITTANAKOM et al., 1986; VATER et al., 2002). Em contrapartida, estudo mais recente com *B. subtilis* GS67, tem demonstrado que a fengicina protege *C. elegans* de patógenos Gram-positivos (FARZAND, et al., 2019) e a plipastatina (fengicina) foi identificada como a principal molécula de *B. subtilis* responsável pela inibição de *S. aureus* na pele (GONZALEZ, et al., 2011). O mecanismo de ação das fengicinas é menos conhecido em comparação com outros lipopeptídeos, mas elas também interagem facilmente com as camadas de lipídios e, em certa medida, retêm o potencial para alterar a estrutura da membrana celular e da permeabilidade de uma maneira dose-dependente (DELEU et al., 2005).

3.3.5 Otimização da produção de lipopeptídeos

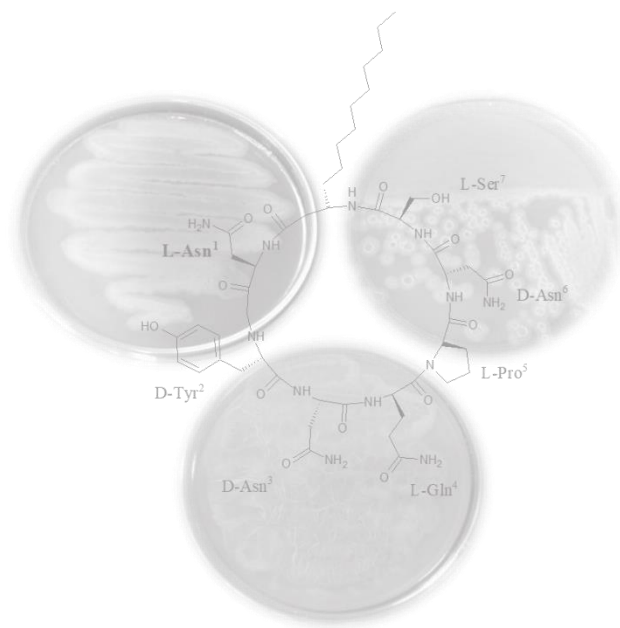
Os parâmetros nutricionais podem influenciar a natureza dos lipopeptídeos produzidos (LI, et al., 2008). No entanto, as principais limitações em sua produção são os custos de produção e os rendimentos. Vários estudos têm sido realizados e diferentes parâmetros operacionais de cultivo, como pH, temperatura, tempo de fermentação e aeração (ABDEL-MAWGOUD, et al., 2008; JHA, et al., 2016; MEENA et al., 2018), concentrações de Mn^{2+} e Fe^{2+} (AL-AJLANI, et al., 2007) fontes de carbono (LIU, et al., 2012; SINGH, et al., 2014) fontes de nitrogênio (LIU, et al., 2012; ZHAO, et al., 2015) e a escolha da linhagem, influenciam no aumento da produção de iturinas, surfactinas e fengicinas.

Neste contexto, ferramentas estatísticas tem sido empregada para otimizar as fermentações líquidas afim de reduzir o custo e o tempo envolvido na produção de lipopeptídeos (REIS et al., 2013; RAMKRISHNA, 2010). Por exemplo, um procedimento Plackett-Burman foi aplicado para descobrir que as concentrações de glicose, K_2HPO_4 e uréia tiveram maior influência na produção de lipopeptídeos por *B. subtilis* de 11 variáveis testadas. Posteriormente, foi realizado um Planejamento Composto Central para otimizar três fatores selecionados, encontrando uma concentração máxima de biossurfactante de 3,1

g L⁻¹ quando utilizado 15 g L⁻¹ de glicose, 6 g L⁻¹ de ureia e 1 g L⁻¹ de K₂HPO₄, mantendo os outros parâmetros (MNIF, et al., 2012). Estudos realizados por Zhao e colaboradores (2012, 2015), utilizando *B. amyloliquefacies* para a produção de lipopeptídeos e variando a faixa de pH do meio, mostraram que o maior rendimento na produção dos lipopeptídeos foi ativamente estável sob condições neutras e alcalinas, enquanto que, sob condições ácidas houve uma redução significativa, não havendo produção de lipopeptídeos abaixo de pH 5,0. Ohno e colaboradores (1995) verificaram a dependência da temperatura para a produção de iturina A e surfactina por *B. subtilis* RB14, a partir de fermentação em estado sólido. A temperatura ótima para a iturina A foi de 25 °C, enquanto que para a surfactina foi de 37 °C. O efeito da temperatura também foi significativo nos rendimentos dos outros homólogos de iturina A, havendo um aumento na proporção do homólogo com maior cadeia lateral (C₁₆) com o aumento da temperatura. Yeh e colaboradores (2005) observaram que a velocidade de agitação afetou a produção de surfactina, sendo obtidos melhores rendimentos com velocidades de agitação de 200 rpm e 250 rpm. No entanto, a uma velocidade superior a 350 rpm a produção de surfactina foi reduzida. A metodologia da superfície de resposta também tem sido utilizada para determinar a produção máxima de lipopeptídeos (FAHIM et al., 2012, 2013).

Tendo em vista essas informações, se torna evidente que em processos fermentativos a seleção e otimização de parâmetros são aspectos chaves para a produção da biomolécula de interesse.

4. MATERIAIS E MÉTODOS



4.1 Seleção das linhagens de bactérias endofíticas produtoras de lipopeptídeos

As linhagens bacterianas endofíticas utilizadas neste trabalho foram isoladas de plantas medicinais da Amazônia (Tabela 5) e pertencem à coleção de trabalho do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LabMicrA) da Universidade Federal do Amazonas. Elas foram selecionadas para continuar estudos realizados anteriormente (MESQUITA, 2015), pois apresentaram atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e apresentaram maior rendimento na produção de lipopeptídeos. Tanto o trabalho anterior quanto o presente foram cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número AAB7B74.

Tabela 5. Bactérias endofíticas de plantas medicinais da Amazônia.

Nº	Código de Identificação		Planta de origem
1	50	GhcC1 2.1a	Casca do Caule de <i>Gustavia hexapetala</i>
2	164	PpC1 2.2b	Caule de <i>Piper peltata</i>
3	196	DgcR2 1.1b	Casca da raiz de <i>Duquetia stelechantha</i>

4.2 Caracterização morfológica e análise por biologia molecular das linhagens bacterianas

Para se ter conhecimento das características morfológicas das linhagens estudadas foi aplicada a coloração de Gram (HARLEY, 2005) e para identificação taxonômica foi realizado o método de amplificação e sequenciamento do 16S rDNA (SANGER et al., 1975).

4.2.1 Coloração de Gram

Nesta análise, preparou-se o esfregaço em uma lâmina de vidro limpa com uma gota de água onde emulsionou-se o microrganismo retirado do cultivo em meio semi-sólido espalhando-se até formar uma película fina a ser fixada rapidamente pelo calor. A técnica de coloração foi realizada cobrindo-se o esfregaço fixado com corante cristal violeta e solução aquosa de iodeto de potássio (Lugol) por um minuto respectivamente e retirando-se o excesso lavando com água corrente. Descoloriu-se a lâmina com etanol 95% por 30 seg.

e retirou-se com água corrente. Por último, cobriu-se o esfregaço com solução de fucsina por 30 seg., e removeu-se o excesso do corante lavando-se a lâmina com água corrente. Após as etapas de coloração retirou-se o excesso de água da lâmina deixando-a secar a temperatura ambiente para posterior observação em microscópio óptico, utilizando-se objetiva de maior aumento (100 x) e oculares de 10x utilizando-se óleo de imersão. Observou-se se as bactérias adquiriram a coloração azul violeta - gram-positivas ou rosa - gram-negativas.

4.2.2 Classificação por biologia molecular

a) Extração de DNA cromossômico total

As linhagens bacterianas selecionadas (item 4.1) foram reativadas por 24 horas, a 28 °C, em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura líquido YM (20 g de sacarose, 2,7 g de extrato de levedura, 2,7 g de extrato de malte e 9 g de peptona, adicionados e autoclavados em 1000 mL de água destilada). Após a reativação, 3 mL de cada cultura foram centrifugadas a 12.000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante e obtendo-se um precipitado, o qual foi ressuspensão em 100 µL de tampão GET (Tris-HCL 100 mM pH 7,5, 50 mM EDTA, dextrose 0,3 mM). Em seguida acrescentou-se 30 µL de lisozima e 0,1 volume de SDS 10%, e os tubos foram incubados no banho-maria a 37 °C por 30 minutos. As amostras foram retiradas do banho-maria e adicionou-se igual volume de acetato de potássio 5 M, deixando-se no gelo por 15 min. Depois desse período as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido a um novo tubo eppendorf, ao qual adicionou-se 1 volume de álcool isopropílico, seguindo-se a incubação por 30 minutos. Em seguida foi realizada a centrifugação a 12.000 rpm, e logo após descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de etanol 70%. Centrifugou-se novamente por 10 minutos a 12000 rpm, sendo descartado o sobrenadante e o precipitado obtido (DNA) foi seco à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Após a secagem, foram adicionados aos tubos 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 e EDTA 1 mM). Para verificar a extração e estimar a concentração de DNA, foram colocados 5 µL do DNA genômico de cada amostra e 5µL de tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo 1 µg.mL⁻¹. Foi realizada

a foto documentação das imagens com auxílio de transluminador com luz ultravioleta.

b) Amplificação do DNA pela reação de PCR

Para a amplificação da região 16S do rDNA, sequências de cerca de 1.000 pb foram amplificadas a partir do DNA cromossomal, utilizando primers (400 pb) F-ACTCCTACGGRAGGCAGCAG e (400 pb) R-GGGACTACCAGGGTATCTAAT. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando aproximadamente 50 ng de DNA, 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 mL de tampão (1 x), 2,5 mM de dNTPs, 5,0 pmol.uL⁻¹ de Primer F, 5,0 pmol.uL⁻¹ de Primer R e 1,5 u.uL⁻¹ de TAQ DNA polimerase (Fermentas Life Science) para um volume final de 25 mL. Foi utilizado o termociclador BIO RAD (modelo T100™ Thermal Cycler) programado para: desnaturação inicial de 3 min. a 95 °C; 35 ciclos de: desnaturação a 95 °C por 15 seg., anelamento a 59 °C por 15 seg. e extensão a 72 °C por 45 seg.; e extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% preparado com tampão TEB 1X e corado com brometo de etídio a 10 µg.mL⁻¹.

c) Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR

Os produtos amplificados foram purificados com o kit comercial IllustraGFX™ (GE) e submetido ao sequenciamento pelo método de Sanger et al. (1975) utilizando-se o sequenciador da Applied Biosystems/ HITACHI, modelo 3500 Genetic Analyzer. As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando-se o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Toll).

4.3 Seleção do meio de cultivo para a produção dos lipopeptídeos

Inicialmente as investigações da produção de lipopeptídeos foi realizada com as linhagens GhCC1 2.1a, PpC1 2.2b e DgcR2 1.1b em 4 meios de cultivos, a fim de selecionar o mais apropriado para um maior rendimento dos extratos lipopeptídicos: ISP2 (*International Streptomyces Project 2*), YM (*Yeast-Malt*), Landy e NB (*Nutrient Broth*), os três últimos selecionados da literatura (MESQUITA, 2015; YASEEN et al., 2017) e ISP2 por ser o meio de preservação, a fim de selecionar as melhores condições nutricionais para o

maior rendimento dos extratos lipopeptídicos. Neste processo, as condições de pH (6,5), agitação (120 rpm) e temperatura (26 °C) foram constantes para todos os meios analisados com base na literatura (DHANARAJAN et al., 2014; MNIF & GRHIBI, 2015) e ensaios prévios.

Os meios de cultivo contêm as seguintes composições em g.L⁻¹:

a) YM		b) ISP2	
Sacarose	20	Amido	10
Peptona	9	Glicose	4
Extrato de levedura	2,7	Extrato de malte	10
Extrato de malte	2,7	Extrato de levedura	4
c) Landy		d) NB	
Glicose	20	Glicose Anidra	1
Arginina	5	NaCl	6
MgSO ₄	0,5	Extrato de levedura	3
KCl	0,5	Peptona	15
KH ₂ PO ₄	1		
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5		
MnSO ₄	0,005		
Extrato de levedura	0,1%		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,016		

4.4 Cultivo e extração dos lipopeptídeos em escala analítica

Para o pré-inóculo, alíquotas de 5 mL do meio YM foram distribuídas em 5 tubos de ensaio que foram lacrados com tampões de algodão e gaze e autoclavados a 121 °C e 1 ATM por 15 min. Após o resfriamento à temperatura ambiente, foram inoculados nos tubos, em cabine de segurança biológica, 20 µL de células oriundas da linhagem bacteriana preservada e os frascos foram incubados em incubadora *shaker* (SOLAB Modelo 222/250) a 26 °C, sob agitação de 120 rpm, por aproximadamente 24 h ou até obter uma turvação correspondente a 2 da escala do padrão McFarland, correspondendo a 6 x10⁸ cel/mL. Este padrão consiste da mistura de 9,95 mL de uma solução de H₂SO₄ a 1% e 0,05 mL de uma solução de BaCl₂ 1% (DEMEDEIROS, 2010).

Após cada pré-inóculo alcançar a turbidez desejada, com auxílio de uma micropipeta, alíquotas de 300 µL foram adicionadas em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de cada meio líquido esterilizados: YM, ISP2, LANDY e NB. Os Erlenmeyers foram incubados sob agitação de 120 rpm, a 26 °C por 72 h, quando atingia a turvação entre 6 e 8 da escala (18x10⁸ cel/mL e 24x10⁸ cel/mL,

respectivamente) de McFarland. Todo este processo foi realizado em quintuplicata para as três linhagens selecionadas.

Após a obtenção, os metabólitos produzidos pelas bactérias endofíticas foram transferidos para tubos falcon estéreis de 50 mL. Posteriormente, cada quintuplicata foi centrifugada (*ependorf*, Modelo Centrifuge 5810 R) a 4.000 rpm e 4 °C por 20 minutos, separando-se os líquidos cultivados da massa celular e transferido-os para novos tubos falcon. Os líquidos cultivados foram filtrados em membrana (0,22 µm) sendo posteriormente identificados como sobrenadante.

4.4.1 Obtenção dos extratos lipopeptídicos

As extrações dos lipopeptídeos presentes nos sobrenadantes dos cultivos em escala analítica das linhagens GhCC1 2.1a (LP50), PpC1 2.2b (LP164) e DgcR21.1b (LP196) foram realizadas por acidificação do sobrenadante com HCl 6 M a pH 2 (LIU et al., 2012, PEYPOUX et al., 1994, RZAFINDRALAMBO et al., 1993). Após, as amostras ficaram por 10 horas a 4 °C para completar a precipitação. Em seguida, foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos e o meio líquido fermentado ácido foi separado do precipitado. O precipitado de cada amostra foi transferido para frascos previamente pesados e secos em dessecador, gerando os extratos lipopeptídicos – LP50, LP164 e LP196, respectivamente.

4.5 Avaliação da produção de lipopeptídeos por Planejamento fatorial

Após a seleção do meio de cultivo, avaliou-se a influência das condições de cultivo (variáveis de processo) na produção de lipopeptídeos das linhagens GhCC1 2.1a, PpC1 2.2b e DgcR2 1.1b utilizando um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , com repetição no ponto central (BARROS NETO et al., 2002), onde as fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, nas quais as variáveis analisadas foram: velocidade de agitação (120, 150 e 180 rpm), temperatura (26, 30 e 34 °C), pH (5, 6 e 8) e volumes de meio (90 mL, 150 e 180 mL, relativos a V_m/V_f de 0,36, 0,60 e 0,72, respectivamente). A razão de aeração (V_m/V_f) é definida como a razão entre o volume de meio de cultivo e o volume do frasco (BEZERRA et al., 2012). A Tabela 6 apresenta os fatores com os níveis estudados, escolhidos a partir de dados da literatura (BEZERRA, 2012; DHANARAJAN, et al., 2014) e de ensaios preliminares realizados.

Tabela 6. Variáveis e níveis para o planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central.

VARIÁVEIS	NÍVEIS		
	(-1)	0	(+1)
Agitação (rpm)	120	150	180
Temperatura (°C)	26	30	34
pH	5	6	8
Razão de aeração (RA)	0,36	0,60	0,72

O planejamento fracionário 2^{4-1} foi construído a partir do planejamento fatorial completo 2^3 para as variáveis 1, 2 e 3. Para a a variável 4 foi atribuído o produto dos sinais obtidos pela interação das colunas 1, 2 e 3. A Tabela 7 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central. Os ensaios foram realizados obedecendo a aleatoriedade (BARROS NETO et al., 2002). Seleccionadas as variáveis, realizou-se então um planejamento fatorial composto central 2^2 com duplicata no ponto central, o qual permite o estudo de um número maior de níveis, viabilizando a obtenção de um modelo empírico e a geração de uma superfície de resposta, permitindo estabelecer as melhores condições experimentais (VICENTINI et al., 2011). Os novos valores para análise, de agitação, pH e aeração foram seleccionados a partir de ensaios prévios. A agitação variou de 108 a 192 rpm, o pH entre 4,3 – 8,3 e aeração de 0,31 a 0,88. A partir dos novos dados do planejamento foi construída a Tabela ANOVA (*Analysis of Variance*) e, em seguida, a superfície de resposta e o gráfico de contorno.

Tabela 7. Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central.

Ensaio	Fatores				Agitação (RPM) (v1)	Temperatura (°C) (v2)	pH (v3)	RA (v4)	Ordem de execução
	v1	v2	v3	v4					
1	-	-	-	-	120	26	5	0,36	1°
2	-	-	+	+	120	26	8	0,72	5°
3	-	+	-	+	120	34	5	0,72	3°
4	-	+	+	-	120	34	8	0,36	7°
5	+	-	-	+	180	26	5	0,72	2°
6	+	-	+	-	180	26	8	0,36	6°
7	+	+	-	-	180	34	5	0,36	4°
8	+	+	+	+	180	34	8	0,72	8°
9*	0	0	0	0	150	30	6,5	0,60	9°
10*	0	0	0	0	150	30	6,5	0,60	10°
11*	0	0	0	0	150	30	6,5	0,60	11°

9*,10* e 11* - Pontos central

A análise do planejamento foi efetuada com o auxílio do programa Microsoft Excel e Octave 2.4.1.

4.6 Cultivo em escala ampliada da linhagem PpC1 2.2b

Com base nos resultados dos rendimentos obtidos em escala analítica a linhagem PpC1 2.2b foi selecionada para o cultivo em escala ampliada em meio de cultivo YM. A reativação, pré-inóculo e condições de cultivo foi realizada como descrito no item 4.4. Foram utilizados 25 erlenmeyers, (quantidade suportada no equipamento *shaker*) por 7 vezes, totalizando um volume de 17,5 L de meio de cultivo YM.

Após a obtenção dos meios metabólitos de cada etapa (25 erlenmeyers = 2,5 L), produzido pela bactéria PpC1 2.2b, foram transferidos para frasco de vidro esterilizados de 1 L, seguidos da centrifugação (HITACH, Modelo CR 21G) a 10.000 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 frascos de vidros estéreis, e filtrado em membrana (0,22 µm) (sobrenadante) e armazenado para a posterior extração dos lipopeptídeos.

A extração dos lipopeptídeos presentes no sobrenadante da linhagem PpC1 2.2b foi realizado como descrito no item 4.4.1. Após a obtenção do precipitado, este foi extraído com MeOH grau HPLC por 3 x. A fase orgânica foi concentrada em rota evaporador e transferida para o dessecador para total evaporação do solvente em frasco previamente pesado, obtendo assim o extrato semi-purificado LP164 (6,2 g).

4.7 Estudo cromatográfico para purificação dos lipopeptídeos

A fim de purificar os lipopeptídeos e separar os grupos de íons com tempos de retenção próximos iniciamos um estudo exploratório a partir do fracionamento em escala analítica do extrato LP164 utilizando cromatografia em cartucho de SPE (*Solid Phase Extration*).

4.7.1 Cromatografia em cartucho de SPE- escala analítica

As frações lipopeptídicas em escala analítica foram obtidas usando um cartucho SPE contendo sílica C18-E (55 µm, 70 Å), 20 g /60 mL, Strata® Phenomenex. Inicialmente ativou-se a sílica com MeOH 100% e em seguida o

condicionamento foi realizado com 150 mL de MeOH/H₂O 1:1 sob sistema de vácuo utilizando um sistema de extração Manifold-SPE com 12 posições, Agilent Technologies. Após o condicionamento foi adicionado a amostra do extrato LP164, previamente preparada pela dissolução de 300 mg da amostra em 2 mL de MeOH. A eluição foi realizada nas proporções de MeOH/H₂O 1:1 (150 mL), MeOH/H₂O 7:3 (100 mL), MeOH/H₂O 85:15 (100 mL) e MeOH 100% (200 mL). (Figura 11 e Figura 12). As frações foram concentradas, identificadas e armazenadas em dessecador até a secagem.

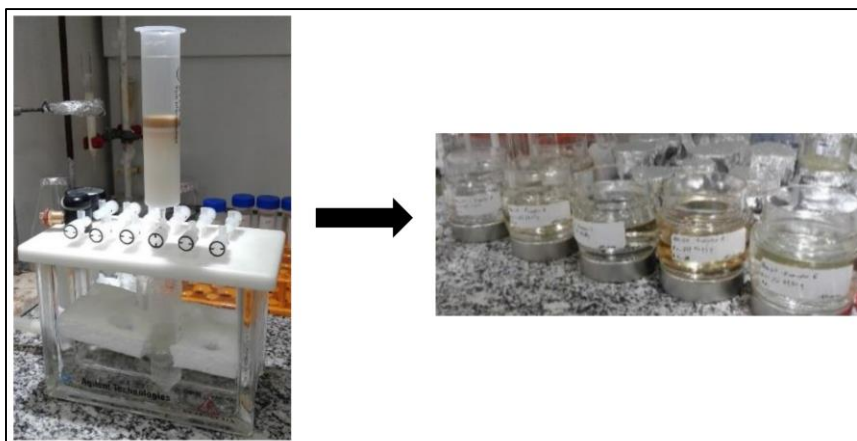


Figura 11. Cromatografia do extrato LP164 em sílica C18-E.

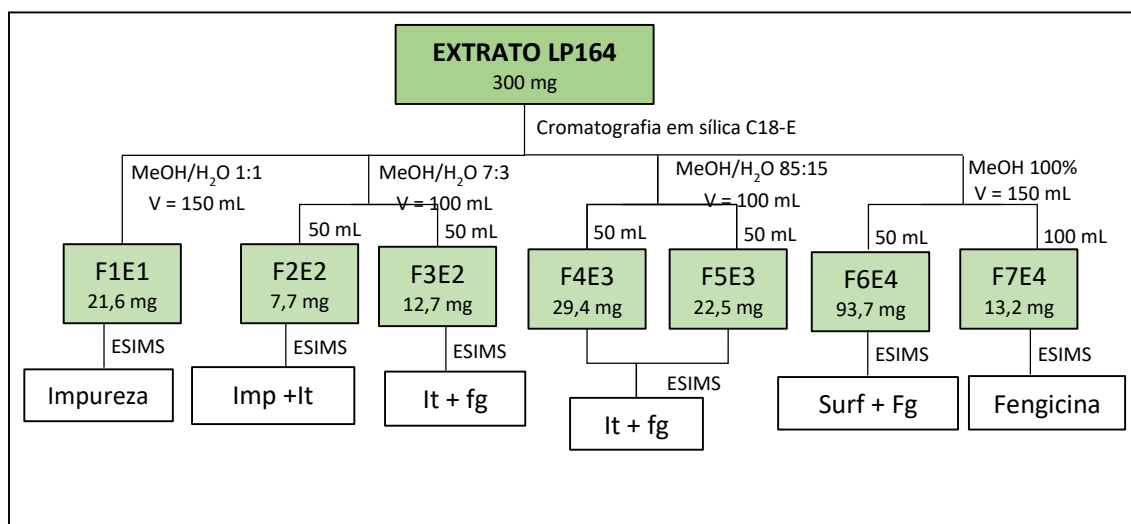


Figura 12. Fluxograma do fracionamento por SPE do extrato LP164 em escala analítica.

A partir das análises por inserção direta das frações obtidas verificou-se que o gradiente de eluição (MeOH/H₂O, 70:30, 85:15 e 100%) utilizado não foi suficiente para separar os grupos dos lipopeptídeos, iturina, surfactina e

fengicina. Com isso, na escala preparativa (item 4.7.2) foi realizado o fracionamento com gradientes de eluição variando apenas 5%, a partir do segundo sistema de MeOH/H₂O 70:30.

4.7.2 Cromatografia em cartucho de SPE- escala preparativa

As frações lipopeptídicas em escala preparativa também foram obtidas utilizando cartucho SPE contendo sílica C18-E como metodologia descrita no item 4.7.1, a partir de 4 g do mesmo extrato semi-purificado LP164. A coluna foi eluída com: MeOH/H₂O 1:1 (300 mL), MeOH/H₂O 70:30 (200 mL), MeOH/H₂O 75:25 (200 mL), MeOH/H₂O 80:20 (200 mL), MeOH/H₂O 85:15 (200 mL), MeOH/H₂O 90:10 (200 mL), MeOH/H₂O 95:05 (200 mL), e MeOH 100% (300 mL) (Tabela 8). As frações foram concentradas, identificadas e armazenadas em dessecador até a secagem.

Tabela 8. Frações da escala preparativa.

Amostra	Sistema de Eluição	Frações (Rendimento - mg)
EXTRATO LP164 (4 g)	MeOH/H ₂ O 1:1 (E1) (V = 300 mL)	BaP-1 (603,02) BaP-2 (156,6) BaP-3 (15,5) BaP-4 (8,4)
	MeOH/H ₂ O 7:3 (E2) (V = 200 mL)	BaP-5 (107,2) BaP-6 (210,4) BaP-7 (218,0) BaP-8 (59,2)
	MeOH/H ₂ O 75:25 (E3) (V = 200 mL)	BaP-9 (119) BaP-10 (103,6) BaP-11 (107,4) BaP-12 (57,1)
	MeOH/H ₂ O 8:2 (E4) (V = 200 mL)	BaP-13 (72,3) BaP-14 (83,0) BaP-15 (102,9) BaP-16 (98,2)
	MeOH/H ₂ O 85:15 (E5) (V = 200 mL)	BaP-17 (144,6) BaP-18 (129,4) BaP-19 (104,1) BaP-20 (59,9)
	MeOH/H ₂ O 9:1 (E6) (V = 200 mL)	BaP-21 (166,0) BaP-22 (143,0) BaP-23 (150,2) BaP-24 (127,1)
	MeOH/H ₂ O 95:5 (E7) (V = 200 mL)	BaP-25 (66,9) BaP-26 (93,4) BaP-27 (59,0) BaP-28 (35,0)
	MeOH 100% (E8) (V = 300 mL)	BaP-29 (64,9) BaP-30 (58,3) BaP-31 (15,2) BaP-32 (4,0)

4.7.3 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (HPLC)

As análises em HPLC analítico foram realizadas em um cromatógrafo Acella® (Thermo Scientific), operando simultaneamente com um detector PDA e um detector de EM (Espectrometria de Massas) (TSQ Quantum access - Thermo Scientific).

O isolamento por HPLC semi-preparativo foi realizado em cromatógrafo modelo UFLC® (Shimadzu), equipado com duas bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A5, detector de ultravioleta (UV) SPD-20AV, modulo de comunicação CBM 20A e válvula de injeção Rheodyne (200 µL).

4.7.4 Métodos espectrométricos e espectroscópicos

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro do tipo triplo-quadrupolo, modelo TSQ *Quantum Access*, operando com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI) ou ionização por *electrospray* (ESI) nos modos positivo e negativo. As análises de EM foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (Central Analítica) da Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

Os espectros de MS² foram registrados em espectrômetro do tipo micrOTOF Q-II com analisador "Time-of-Flight" de alta resolução da marca Bruker Daltonics, modelo Amazon Speed com fonte de ionização ESI, no modo positivo.

Os espectros de RMN em uma e duas dimensões (1D e 2D) foram adquiridos em equipamentos Bruker, modelo AVANCE II HD, operando a 11,75 Tesla (T), observando ¹H a 500,13 MHz, e ¹³C a 125,76 MHz, equipado com uma sonda multinuclear de 5 mm (BBFO Plus SmartProbe™) com gradiente de campo na direção Z. As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-D₆) (Cambridge Isotope).

Todos os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm relativos ao sinal do tetrametilsilano (TMS). As constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz).

4.7.5 Estudo do perfil químico dos extratos e frações lipopeptídicas por ESI-MS ou APCI-MS

Foram utilizados os extratos obtidos (LP50, LP164, LP196) durante o cultivo em escala analítica. Estes extratos foram preparados em metanol na concentração de 1 mg.mL⁻¹ (solução estoque). Alíquotas (10 µL) das soluções estoque foram posteriormente diluídas a 10 µg.mL⁻¹, sendo as soluções resultantes analisadas por inserção direta no espectrômetro de massas.

Todos os espectros de massas foram registrados utilizando-se um equipamento TSQ Quantum Access, equipado com fonte de ESI ou APCI e operando nos modos positivo e negativo de aquisição para as análises de ESI-MS ou APCI-MS. As condições analíticas da análise para a fonte ESI foram as seguintes: *spray voltage*, 4,5 kV; *sheath gas*, 35 arb; *auxiliary gas*, 10 arb; *sweep gas*, 0 arb; *capillary temp*, 300 °C; *capillary voltage*, 35 V; *tube lens*, 175 V; *mass range*, *m/z* 200 a 2000; *colision gas*, He. Para a fonte APCI foram: *spray voltage*, 4,5 kV; *sheath gas*, 35 arb; *auxiliary gas*, 3 arb; *vaporizer temp*, 400 °C; *capillary temp*, 253 °C; *capillary voltage*, 35 V; *tube lens*, 175 V; *mass range*, *m/z* 200 a 2000.

Os espectros de MS² foram obtidos utilizando um equipamento micrOTOF Q-II, com fonte ESI, em modo positivo. A energia de colisão aplicada foi de 50-60 eV.

4.7.6 Análises das frações lipopeptídicas de PpC1 2.2b por HPLC

A partir da separação das famílias da iturina, surfactina e fengicina por cromatografia em sílica C18-E em escala ampliada (item 4.7.2), foi realizado o estudo cromatográfico por HPLC-MS, utilizando nas análises diferentes colunas e condições cromatográficas em busca do método para o isolamento das substâncias de cada grupo lipopeptídico. Foram injetados 10 µL de cada solução estoque (1 mg mL⁻¹) das frações lipopeptídicas.

4.7.7 Estudo cromatográfico e isolamento dos lipopeptídeos da família da iturina

Para o estudo cromatográfico e isolamento dos lipopeptídeos foram utilizadas as frações obtidas do fracionamento cromatográfico com sílica C18-E em escala ampliada (item 4.7.2).

Inicialmente foi realizado um estudo cromatográfico utilizando a fração BaP-11 (item 4.7.2), com diferentes colunas analíticas [amino (NH₂)] de 150 x 4,6 mm (100 Å, 5 µm) – Phenomenex; Luna® PFP (Pentafluorofenil Propilo) de 150 x 4,6 mm (100 Å, 5 µm) Phenomenex; Luna® Phenyl-Hexyl de 150 x 4,6 mm (5 µm) Phenomenex e Luna® C-18 de 150 x 4,6 mm (100 Å, 5 µm) Phenomenex) e condições de eluição utilizando MeOH (B) e água (A) como fase móvel. Após várias tentativas, o método de separação foi otimizado a partir dos seguintes parâmetros de análises: modo de eluição isocrático, utilizando como fases móveis água (A) e metanol (B), com 70% de B em 20 minutos, fluxo de 0,635 mL/min, volume de injeção 10 µL e detector de DAD monitorando na faixa de 200-400 nm. As condições da fonte APCI foram: *spray voltage*, 4,5 kV; *sheath gas*, 35 arb; *auxiliary gas*, 3 arb; *vaporizer temp*, 500 °C; *capillary temp*, 300 °C; *capillary voltage*, 35 V; *tube lens*, 175 V; *mass range*, *m/z* 200 a 2000.

A partir do método cromatográfico desenvolvido o isolamento das frações BaP-7 (210 mg), BaP-9 (90 mg), BaP-11 (100 mg) e BaP-12 (90 mg) foi realizado em cromatógrafo semi-preparativo (item 4.7.3) usando o seguinte escalonamento: concentração da amostra, 300 mg.mL⁻¹ preparadas em metanol/DMSO (1:1), volume de injeção, 100 µL, fluxo, 5 mL/min e os picos de interesse foram coletados no comprimento de onda de 243 e 283 nm. As análises foram realizadas utilizando coluna fenil-hexil (Luna) de 250 x 10,0 mm (5 µm) da Phenomenex, com fase móvel composta por água (A) e metanol (B), com eluição isocrática de 70% de B em 25 minutos. O fracionamento das frações BaP-7, BaP-9, BaP-11 e BaP-12 resultaram em 4, 8, 3 e 4 subfrações, respectivamente. Após análises por MS e LC-MS em equipamento TSQ Quantum Access, cinco destas subfrações (Iturina A1- A5) (Tabela 9) foram encaminhadas para análises de RMN 1D e 2D e MS².

Tabela 9. Amostras de iturinas submetidas à análise de RMN 1D e 2D e MS².

Código	Massa obtida (mg)
Iturina A1	46,8
Iturina A2	70,2
Iturina A3	18
Iturina A4	15
Iturina A5	5

4.7.8 Estudo cromatográfico e isolamento dos lipopeptídeos da família da surfactina

A partir dos resultados obtidos pelas análises cromatográficas das iturinas as frações contendo surfactinas também foram analisadas utilizando a coluna Phenyl-Hexyl de 150 x 4,6 mm (5 µm) Phenomenex, como descrito no item 4.7.7, utilizando como fase móvel água (A) e metanol (B), em modo isocrático com 85% de B em 40 minutos (0,635 mL/min).

Para o isolamento das surfactinas foram utilizadas as amostras BaP-21 (90 mg), BaP-22 (120 mg) e BaP-24 (120 mg), preparadas separadamente e submetidas a fracionamento em cromatógrafo semi-preparativo como descrito no item 4.7.7. As fases móveis utilizadas foram compostas por água (A) e metanol (B), com eluição isocrática de 85% de B por 30 minutos em coluna fenil-hexil (Luna) de 250 x 10,0 mm (5 µm) da Phenomenex. O fracionamento de BaP-21 resultou em 10, BaP-22 em 6 e BaP-24 em 5 subfrações. Após análises por MS e LC-MS em equipamento TSQ Quantum Access, cinco subfrações (Surfactina A1 – A5) (Tabela 10) foram encaminhadas para análises de RMN 1D e 2D e MS².

Tabela 10. Amostras de surfactinas submetidas à análise de RMN 1D e 2D e MS².

Código	Massa obtida (mg)
Surfactina A1	8
Surfactina A2	20
Surfactina A3	12
Surfactina A4	15
Surfactina A5	2

4.7.9 Estudo cromatográfico e isolamento dos lipopeptídeos da família da fengicina

O estudo cromatográfico dos lipopeptídeos da fengicina também foi realizado utilizando as colunas como descrito no item 4.7.7. Após várias análises da fração BaP-18, as melhores condições de separação dos lipopeptídeos das fengicinas foram as seguintes: coluna C-18 de 150 x 4,6 mm (100 Å, 5 µm) Phenomenex), fases móveis de solução aquosa ácida (ácido fórmico 0,2%) (A) e metanol (B), isocrática com 75% de B em 25 minutos, fluxo de 0,635 mL/min,

volume de injeção 10 µL e detector de DAD monitorando na faixa de 200-400 nm. As condições da fonte ESI foram as seguintes: *spray voltage*, 4,5 kV; *sheath gas*, 40 arb; *auxiliary gas*, 20 arb; *sweep gas*, 0 arb; *capillary temp*, 350 °C; *capillary voltage*, 35 V; *tube lens*, 175 V; *mass range*, *m/z* 200 a 2000; colision gas, He.

Após a determinação do método cromatográfico, o isolamento das amostras da fengicina foi realizado com as amostras BaP-18 (100 mg) e BaP-19 (90 mg), preparadas separadamente e submetidas a fracionamento em cromatógrafo semi-preparativo como descrito no item 4.7.7. As fases móveis utilizadas foram compostas por solução aquosa acidificada (ácido fórmico 0,2%) (A) e metanol (B), com eluição isocrática de 75% de (B) por 40 minutos em coluna C18 (Luna) (5 µm, 250 x 10,00 mm) da Phenomenex. O fracionamento de BaP-18 resultou em 5, e BaP-19 em 6 subfrações. Após análises por MS e LC-MS em equipamento TSQ Quantum Acess, duas subfrações (Fengicina AB1 e AB2) (Tabela 11) foram encaminhadas para análises de RMN 1D e 2D e MS².

Tabela 11. Amostras de fengicina submetidas à análise de RMN 1D e 2D e MS².

Código	Massa obtida (mg)
Fengicina AB1	18
Fengicina AB2	15

4.8 Ensaio Biológicos

Os extratos, frações e isolados lipopeptídicos, foram submetidos a ensaios para detecção de atividade anti-inflamatória, antimálarica e antibacteriana.

Os ensaios anti-inflamatório foram realizados no Laboratório de Atividades Biológicas (BIOPHAR) da Universidade Federal do Amazonas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Emerson Lima. Os testes antimalárica e antibacteriana foram realizados na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus-AM, Brasil, pela técnica Ivanildes dos Santos, sob a responsabilidade da Dra. Patrícia Orlandi.

4.8.1 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado a partir do teste colorimétrico do Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, Brasil Ltda) de acordo com Mosmann (1983), baseado na redução enzimática do MTT para formação de cristais de formazan pela mitocôndria e enzimas desidrogenases celulares. As células de macrófagos murino J774A.1 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/poços em placas de 96 poços e deixadas em incubadora de CO₂ em atmosfera de 37 °C por 24 h, após esse período as células foram expostas a concentrações de 1, 5, 10 e 20 µg/mL das amostras lipopeptídicas (LP50, LP164, LP196, BaP-11, BaP-18 e BaP-24) por 24 h.

Após o tempo de incubação a 37 °C o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 100 µL de tampão PBS 0,1 M, pH 7,4; adicionaram-se 100 µL de MTT (1:1 mg/mL) diluído em meio de cultura RPMI 1640 e incubou-se por 3 h a 37 °C. Decorrido esse tempo as células foram ressuspensas com DMSO: isopropanol (1:1) em cada poço e finalmente as placas foram agitadas delicadamente em um agitador orbital por 15 min a temperatura ambiente para solubilização dos cristais de formazan originados a partir da reação do MTT com enzimas mitocondriais em células viáveis.

Na última etapa a densidade óptica dos poços foi medida em leitor de microplaca (DTX 800, *Beckman Colter*) em 570 nm e os valores de absorbância das células tratadas com o NPA foram comparados com os valores de absorbância obtidos a partir das células controle sem tratamento.

4.8.2 Determinação de nitrito (NO[•])

A produção de NO[•] foi medida pela dosagem de seus produtos de degradação, nitrito, mais estáveis, utilizando o reagente de Griess. Foi quantificado por espectrofotômetro a 550 nm (GREEN et al., 1982). Para a determinação da produção de NO[•], 100 µL do sobrenadante celular foram submetidos à reação com igual volume (100 µL) do reagente de Griess. Após o período de incubação de 10 min as amostras foram lidas em leitor de microplacas (DTX 800, Beckman) a 560 nm. O cálculo das concentrações de nitrito foi realizado com base em curva padrão utilizando diferentes concentrações de NaNO₃ (15 µM até 1000 µM).

4.8.3 Atividade antibacteriana

As amostras LP50, LP164, LP196, Iturina A2, Surfactina A2, e Fengicina AB1 foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% e concentração inicial da amostra de 5 mg/mL no poço.

As linhagens bacterianas utilizadas (Tabela 12) pertencem à bacterioteca da Plataforma de Bioensaios Biotecnológicos (RPT11H), do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus-AM, Brasil. Estas espécies foram indicadas numa reunião da Organização das Nações Unidas (ONU) como patógenos de interesse mundial, que a partir de 2020 poderiam se tornar epidemias mundiais, caso não exista um maior controle hospitalar e também novos medicamentos para o controle destas.

Tabela 12. Linhagens bacterianas utilizadas no ensaio de atividade antibacteriana

Bactéria	Código
<i>Escherichia coli</i>	Butantã: K12-DH52
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352-083
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 14756-131
<i>Pseudomonas putida</i> (oralis)	ATCC 15175-113
<i>Salmonella entérica Choleraesuis</i>	ATCC 10708-028
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (CT)	ATCC 6051
<i>Enterococcus faecalis</i> (Streptococcus faecalis)	ATCC 4083
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 80958

As linhagens foram cultivadas previamente em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (HIMEDIA). As culturas microbianas foram, então, diluídas em meio de cultura conforme a escala de 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A determinação da atividade antibacteriana foi inicialmente realizada pelo método de difusão em ágar, pela técnica do poço, segundo Grove e Randall (1955), com modificações. As amostras testadas foram solubilizadas em DMSO

10%. Utilizou-se o meio de cultura Ágar Müller Hinton (AMH) (HIMEDIA) para a realização dos testes. Como controle positivo foram utilizadas as drogas TIENAM (imipenem + cilastatina sódica) na concentração de 500 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e então foi adicionado às placas uma solução corante de cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) a 0,01% acrescido de 0,1% de ágar bacteriológico, ocorrendo uma reincubação por 30 minutos. Após a conversão de coloração na sobrecamada foi feita a medição dos halos de inibição.

4.8.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição em caldo

Os valores de CIM das amostras ativas no teste de difusão em ágar foram determinados utilizando o método de microdiluição em placa de 96 poço, de acordo com CLSI (2012), com modificações. Cada orifício recebeu o inóculo bacteriano padronizado, as amostras foram solubilizadas em DMSO 10 %, as quais foram avaliadas em concentrações que variaram de 1000 a 7,81 µg/mL, e 20 µL de resazurina a 0,01%, totalizando um volume de 100 µL/poço. Como controle negativo foi utilizado o DMSO 10% e o inóculo bacteriano, como controle positivo. A droga controle imipenem + cilastatina sódica (TIENAM) foi testada nas mesmas concentrações das amostras teste. Em seguida as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A CIM foi definida como a menor concentração das amostras capaz de inibir o crescimento bacteriano, indicado pela permanência da coloração azul da resazurina.

4.8.3.2 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm D.P.M. (Desvio Padrão da Média). Os ensaios foram analisados por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltiplas de Tukey. O valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados paramétricos e não-paramétricos foram calculados através do programa de estatística *GraphPad Prisma* (versão 6.0).

4.8.4 Atividade Antiplasmódica

4.8.4.1 Cultivo in vitro de *P. falciparum*

A Cepa de *P. falciparum* (FRC3) foi cultivada em meio RPMI com 10% de plasma humano AB (Positivo) e eritrócitos humanos normais em atmosfera baixa de oxigênio. Esta suspensão de eritrócitos infectados foi incubada a 37°C em *candle jar*.

4.8.4.2 Avaliação da atividade antiplasmódica por Citometria de Fluxo

Os testes para o estudo da atividade antimalárica foram realizados em placas de 96 poços de fundo chato e a leitura foi realizada por meio da subunidade (RPT08J- Citometria de fluxo-AM). Para a avaliação da atividade antiplasmódica, o cultivo de *P. falciparum* foi realizado de acordo com Trager & Jenson (1976), com parasitemia final a 1% e hematócrito a 2%. As amostras LP50, LP164, LP196, Iturina A2, Surfactina A2 e Fengicina AB1 foram solubilizadas em DMSO (concentração final de 0,5% no poço), nas concentrações que variam de 50 a 0,39 µg/mL. Após 72 horas de incubação, as amostras foram lavadas com o tampão PBS 1X e brometo de etílico. Ao final, as amostras foram ressuspensas em 200 µl de PBS 1X para a análise no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, USA), no canal FL-1 com software Getting Started with BD FACSDiva™ e FlowJo™ versão 10. O crescimento parasitário em DMSO 0,5% foi utilizado como controle positivo, e eritrócitos não parasitados como controle negativo. O quinino foi a droga de referência testada nas mesmas concentrações das amostras dos lipopeptídeos.

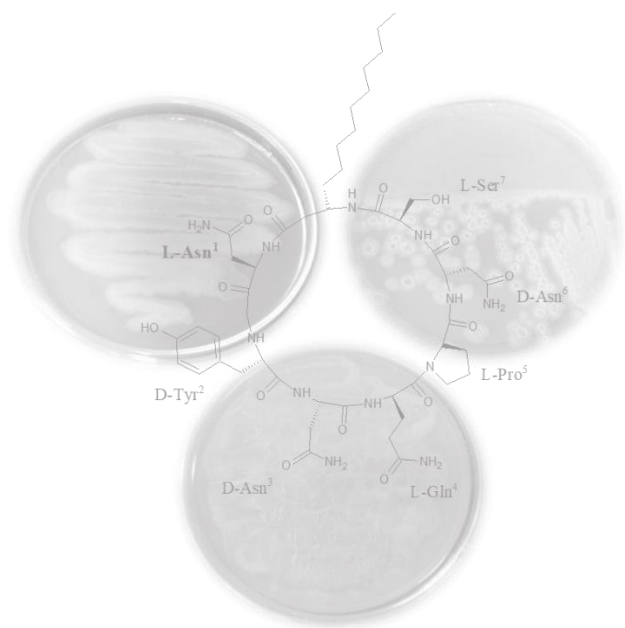
Os resultados obtidos foram comparados de acordo com a classificação adotada por Bagavan e colaboradores (2011) para atividade antiplasmódica apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13. Classificação adotada para a atividade antiplasmódica

Classificação	Concentração inibitória (CI ₅₀)
Alta atividade	<1µg/mL ⁻¹
Boa atividade	1 a <10 µg/mL ⁻¹
Atividade moderada	10 a < 25 µg/mL ⁻¹
Baixa atividade	25 µg/mL ⁻¹ < 100 µg/mL ⁻¹

Fonte: Bagavan et al. (2011)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO



5.1 Identificação por biologia molecular e morfológica das linhagens bacteriana

5.1.1 Identificação morfológica

Os isolados GhCc12.1a, Ppc12.2b e DgCr21.1b apresentaram características morfológicas irregulares e opacas no meio ISP2. Na análise microscópica após a coloração de Gram todos os isolados foram revelados como bacilos corados em azul (Figura 13), sendo assim classificados como bactérias gram-positivas.

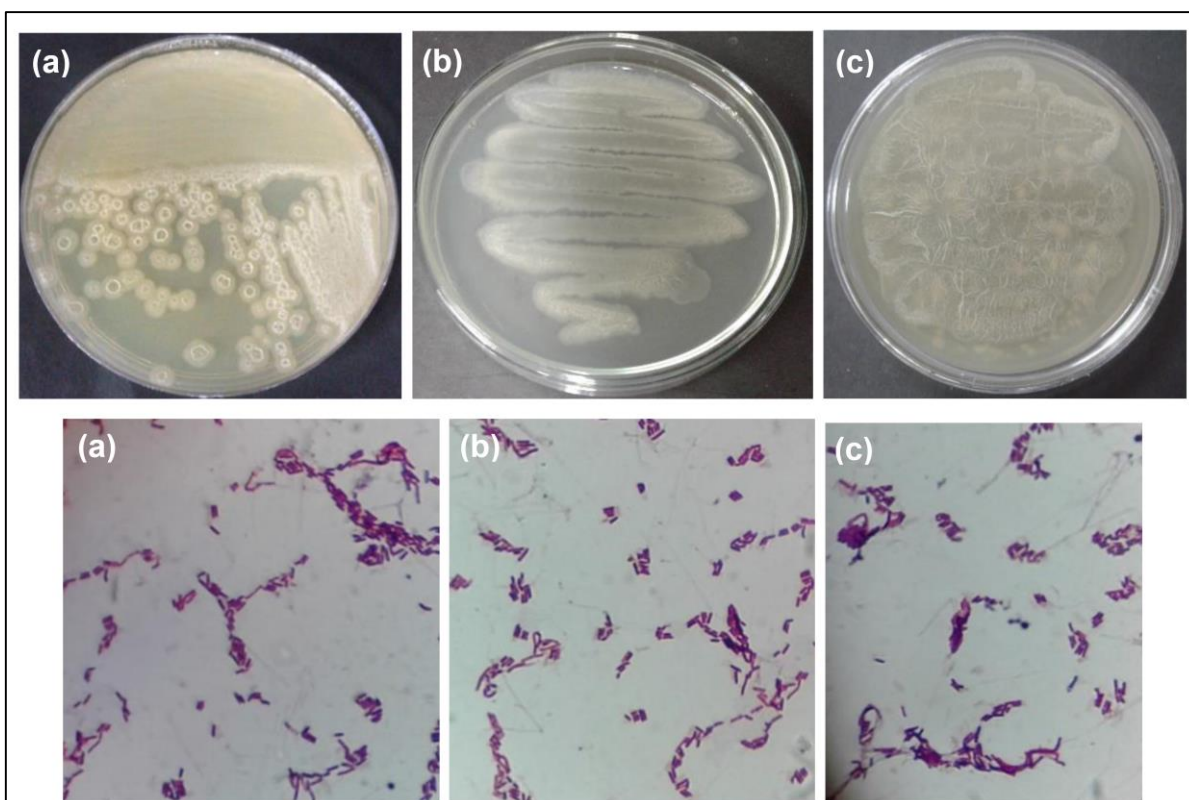
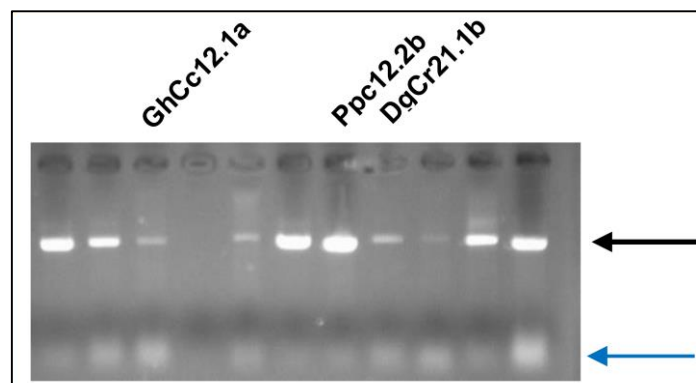


Figura 13. Visualização macro e micro-morfológica das colônias de bactérias endofíticas (a) GhcC1 2.1a, (b) PpC1 2.2b e (c) DgcR2 1.1b.

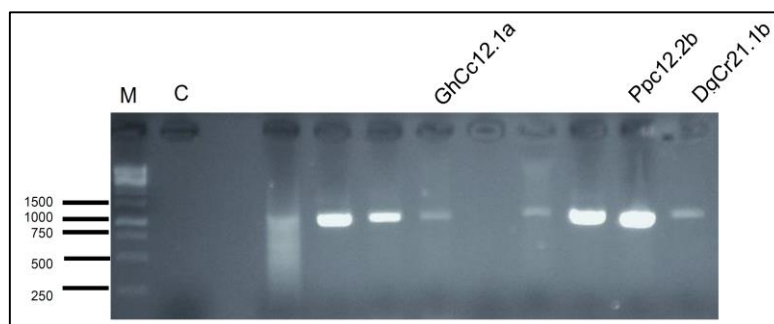
5.1.2 Identificação molecular

O DNA genômico de cada linhagem de bactéria endofítica foi obtido de forma íntegra e levemente contaminado com RNA (Figura 14). Nas condições experimentais (item 4.2.2b) a amplificação da região do gene 16S rDNA a partir do DNA extraído resultou em fragmentos de, aproximadamente, 1000 pares de base (Figura 15).



A seta preta indica uma banda de alto peso molecular correspondente ao DNA genômico. A seta azul indica moléculas de RNA degradadas coextraídas durante o procedimento.

Figura 14. Visualização do padrão eletroforético da extração do DNA genômico das bactérias endofíticas GhcC1 2.1a, PpC1 2.2b e DgcR2 1.1b.



Em aproximadamente 1000 pb a banda correspondente ao gene 16S rDNA. O C é uma amostra sem DNA utilizada como controle negativo, e M, marcador de peso molecular.

Figura 15. Visualização do padrão eletroforético da amplificação da região do gene 16S rDNA das bactérias endofíticas GhcC1 2.1a, PpC1 2.2b e DgcR2 1.1b.

As sequências de nucleotídeos do gene 16S rDNA dos três isolados apresentaram grande similaridade com grupos depositados no GenBank, como pode ser observado na Tabela 14. Os resultados permitiram identificar o gênero bacteriano – *Bacillus* e a espécie *B. amyloliquefaciens* para as três linhagens endofíticas.

Tabela 14. Comparação molecular dos isolados GhcC1 2.1a, PpC1 2.2b e DgcR2 1.1b com bactérias depositadas no GenBank.

Isolado	Total score	Query cover	Erro	Identidade	Espécie	Acesso
GhcC1 2.1a (B50)	841	78%	0.0	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain NBRC 15535	NR_112685.1
PpC1 2.2b (B164)	949	100%	0.0	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain K6	GU591157.1
DgcR2 1.1b (B196)	846	84%	0.0	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain MPA 1034	NR_117946.1

Foi utilizado o programa BLAST para comparar as sequências de interesse com as sequências depositadas no banco de dados.

5.2 Otimização da produção dos lipopeptídeos

A otimização da produção de lipopeptídeos requer uma abordagem holística que geralmente se inicia pela seleção da linhagem produtora seguida pela busca dos melhores parâmetros de bioprocessos (como meio de cultivo, temperatura, agitação, oxigenação e modo de fermentação, etc). Na busca para uma maximização da produção de lipopeptídeos pelas linhagens *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a, *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b e *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b focamos na otimização dos parâmetros de cultivo. Numa primeira etapa, avaliamos 4 diferentes meios de cultivo padrão para selecionar o mais promissor. Depois realizamos a otimização das condições de cultivo através de planejamento fatorial fracionário.

A figura 16 mostra as variações no rendimento dos extratos lipopeptídicos nos 4 diferentes meios de cultivo padrão para as três linhagens de *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a, *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b e *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b. O melhor entre os meios de cultivo analisados (YM, ISP2, LANDY e NB) foi o YM, único com sacarose como fonte de carbono e com três fontes de nitrogênio: peptona, extrato de levedura e extrato de malte. Nas condições experimentais (item 4.3) *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b apresentou o maior rendimento em todos os meios, com o máximo de 633,1 mg.L⁻¹ de YM, um aumento significativo na produção de lipopeptídeos em relação aos demais meios de cultivo (517,5 mg.L⁻¹ no meio ISP2, 457,7 mg.L⁻¹ no meio LANDY e 364,4 mg.L⁻¹ no meio NB) (Figura 16). *B. amyloliquefaciens*

DgcR2 1.1b apresentou o segundo maior rendimento em YM, com 583,3 mg.L⁻¹, e ainda apresentou o maior aumento, acima de 50%, na produção de lipopeptídeos em relação aos demais meios. *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a com 352,8 mg.L⁻¹ apresentou o menor rendimento entre as linhagens analisadas em todos os meios utilizados.

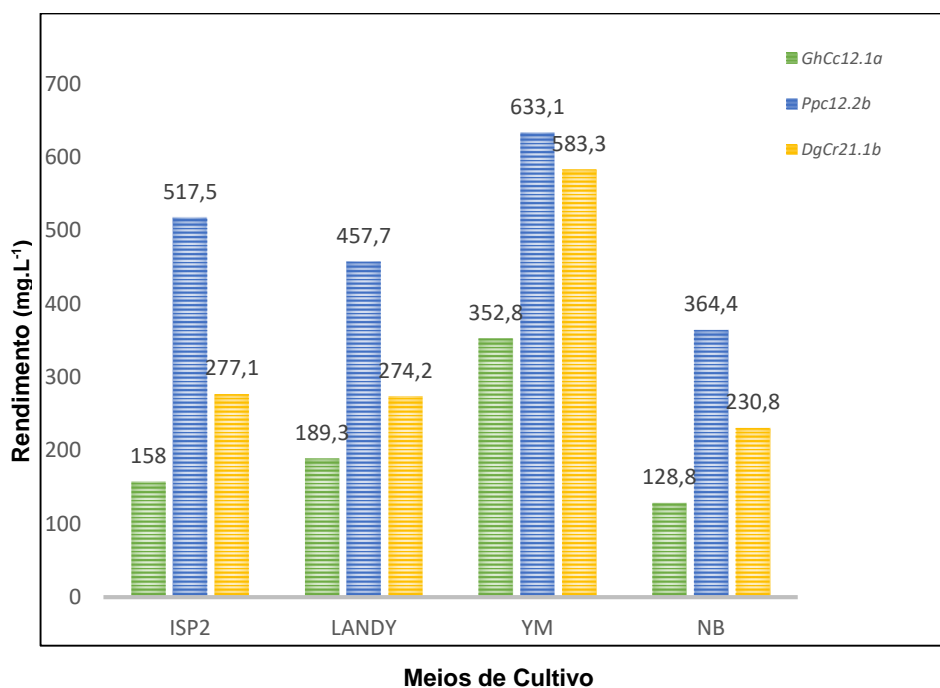


Figura 16. Produção de lipopeptídeos nos diferentes meios de cultivo (YM, ISP2, LANDY e NB) das linhagens de *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a, *B. amyloliquefaciens* PpcC1 2.2b e *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b.

Os maiores rendimentos observados no meio YM para as três linhagens são coerentes com o relato de vários pesquisadores ao utilizarem mais de um tipo de fonte de nitrogênio, obtendo maiores concentrações de biossurfactante (KIM et al., 2006; JING et al., 2006; RANGARAJAN & CLARKE, 2016; ADAMCZAK & BEDNARSKI, 2000; MATA-SANDOVAL et al., 2001). Também está coerente com outros estudos (MEDEOT et al., 2017; BARTAL et al., 2018) que apontam o uso de glicose e principalmente da sacarose como fontes de carbono que favorecem a produção de lipopeptídeos. Em um desses estudos Bartal e colaboradores (2018) avaliaram os parâmetros de cultivo da linhagem *B. subtilis* SZMC 6179J alterando a fonte de carbono do meio de cultura de glicose para outras fontes de carbono, incluindo a sacarose. Os resultados apresentaram um aumento de 11% na produção de uma nova surfactina quando

utilizado a sacarose como fonte de carbono. É um dado em coerência com nossos resultados (Figura 16) pois a sacarose está presente apenas no meio YM.

5.3 Otimização das condições de cultivo por planejamento fatorial

Após a seleção do meio YM, realizamos a otimização das condições de cultivo para as linhagens de *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164), *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50) e *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196) através do planejamento fatorial fracionado do tipo 2^{4-1} (item 4.5). Em um planejamento fatorial, as variáveis são estudadas em apenas dois níveis. Por nível pode-se ter, por exemplo, duas concentrações distintas, dois valores de pH ou a ausência ou presença de uma condição. Em um planejamento fatorial o número de experimentos é resultante da combinação de todas as condições experimentais possíveis. Essas combinações serão resultado da expressão 2^k , onde a base com valor 2 é referente aos dois níveis de uma variável e o expoente k é referente ao número de variáveis que se deseja testar no experimento. As combinações das variáveis são fundamentais para a compreensão do resultado, uma vez que a interação entre duas ou mais variáveis pode ocorrer de maneira sinérgica (causando um aumento no resultado esperado, sendo que esse aumento é maior do que a contribuição isolada de uma variável) ou antagônica. Quando as variáveis a serem testadas são muitas o número de experimentos aumenta exponencialmente, tornando impossível a aquisição de todas as informações sobre a interação das variáveis. Para lidar com esse problema criou-se o planejamento fatorial fracionado, onde no caso deste trabalho, os experimentos realizados referentes a variável v_4 , foram gerados a partir da combinação das outras variáveis existentes ($v_1 \times v_2 \times v_3$), possibilitando dessa forma reduzir pela metade o número de experimentos realizados, sendo essa abordagem largamente utilizada.

5.3.1 Otimização para a linhagem *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164).

Na Tabela 15 são mostrados os experimentos efetuados e a resposta para o rendimento dos extratos lipopeptídicos a partir de cada condição de cultivo realizada (variáveis do processo) para a linhagem *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164). Neste experimento foram utilizadas 3 réplicas no ponto central

(variáveis codificadas em 0, experimentos de 9-11 na Tabela 15) e a quarta variável foi obtida pela multiplicação das colunas das variáveis 1, 2 e 3, sendo a geratriz igual a 1234. Com a configuração desse planejamento fatorial fracionário, os efeitos de primeira ordem (1, 2, 3, e 4) estão confundidos com os de terceira ordem (234, 134, 124, e 123, respectivamente) e os de segunda ordem (12, 13, e 14) estão confundidos entre si. (PEREIRA FILHO, 2018; BARROS NETO et al., 2010). Com os 11 experimentos executados foi possível calcular 7 contrastes (C): 1+234 (C1), 2+134 (C2), 3+124 (C3), 4+123 (C4), 12+34 (C5), 13+24 (C6) e 14+23 (C7).

Tabela 15. Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para verificar a influência de 4 variáveis (v1 a v4) no rendimento da produção de lipopeptídeos de *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164).

Experimentos	Agitação (v1)		Temperatura (v2)		pH (v3)		Aeração (v4)		Rendimento do extrato LP164 (mg)
	Codificado	Real (rpm)	Codificado	Real (°C)	Codificado	Real	Codificado	Real	
1	-1	120	-1	26	-1	5	-1	0,36	33,2
2	-1	120	-1	26	1	8	1	0,72	51,5
3	-1	120	1	34	-1	5	1	0,72	27,4
4	-1	120	1	34	1	8	-1	0,36	65,4
5	1	180	-1	26	-1	5	1	0,72	46,3
6	1	180	-1	26	1	8	-1	0,36	74,2
7	1	180	1	34	-1	5	-1	0,36	56,2
8	1	180	1	34	1	8	1	0,72	104,1
9	0	150	0	30	0	6	0	0,60	66,9
10	0	150	0	30	0	6	0	0,60	65,2
11	0	150	0	30	0	6	0	0,60	66,3

Utilizando a ferramenta do Octave, construiu-se o gráfico de porcentagem (Figura 17a) que mostra a porcentagem que cada efeito exerce sobre o total dos efeitos e o gráfico de probabilidade (Figura 17b) que permite confirmar quais variáveis (nesse caso contrastes, que é a interação entre as variáveis do experimento) apresentam valores estatísticos que contribuem de maneira mais ou menos significativa. Alguns contrastes se encontram próximos a origem do gráfico, indicando que a contribuição para a resposta medida (efeito) é muito próximo de zero, ao passo que as variáveis que se encontram mais distantes da origem são realmente relevantes para a resposta medida, pois acumulam uma

variância maior. A linha azul vertical mostra a posição do zero no eixo x e as duas linhas verticais vermelhas indicam o intervalo de confiança dos efeitos calculados (PEREIRA FILHO, 2018; BARROS NETO et al., 2010).

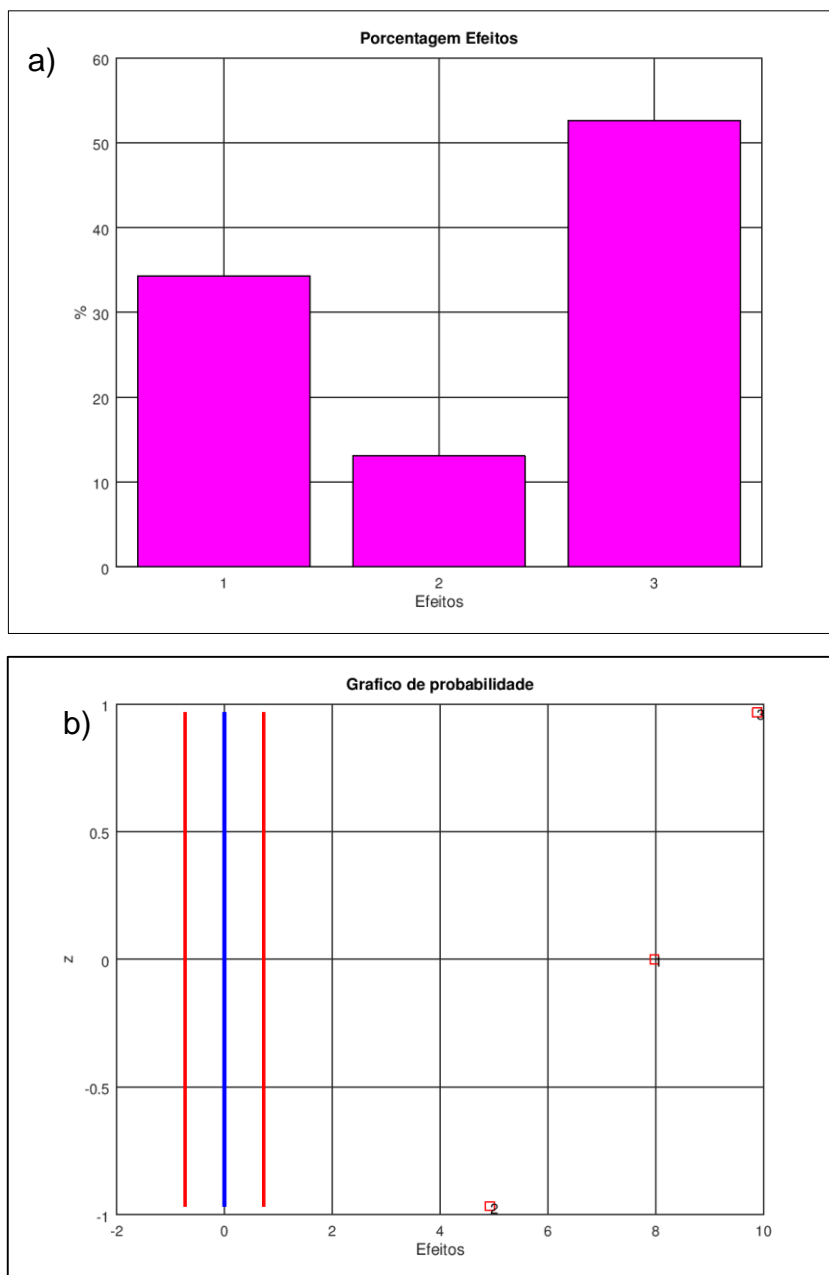


Figura 17. Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164).

No gráfico de probabilidade é notato que os efeitos 3 (relativo à variável 3) e 1 (relativo à variável 1) estão distantes do intervalo de confiança dos efeitos, delimitados pelas duas linhas verticais vermelhas. Além disso, notou-se também que o efeito da variável 2 (identificado com o número 2) não foi tão importante,

estando localizada próxima ao zero no eixo x. Se observarmos no gráfico verificamos também que o efeito 4 (relativo a variável 4) não aparece no gráfico, indicando ter um efeito zero, ou seja, a mesma não exerceu efeito na resposta para a produção dos lipopeptídeos. Assim, as variáveis 2 e 4 foram removidas do planejamento fatorial, resultando então em novas réplicas e permitindo calcular um novo valor para o erro de um efeito.

Como conclusão para *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164), foi possível notar que para o aumento da produção de lipopeptídeos foi necessário, idealmente, aumentar as condições experimentais das variáveis 1 e 3. As variáveis 2 e 4 foram inócuas para a faixa testada de 26 a 34 °C e de 90 a 180 mL (0,36 a 0,72) respectivamente, podendo ser fixadas em qualquer condição dentro destes intervalos.

Visto que os resultados apontaram as variáveis de agitação e pH como sendo as mais importantes, passamos para o refinamento do modelo onde realizamos um novo planejamento fatorial do tipo planejamento composto central (São os conhecidos experimentos no ponto central (nível zero)) (PEREIRA FILHO 2018; BARROS NETO et al., 1996) no sentido de obter uma condição ótima de trabalho. O planejamento fatorial completo é importante nesta etapa, pois ele permite avaliar a significância dos efeitos e obter uma boa estimativa dos erros.

Nesta etapa foi necessário testar as variáveis em mais níveis, sendo testadas em 5 níveis diferentes, que variam de -1,41 a 1,41.

A tabela 16 mostra os experimentos efetuados, bem como os sinais monitorados para as variáveis em questão e as respostas obtidas.

Tabela 16. Condições experimentais do planejamento fatorial composto central realizado para *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164).

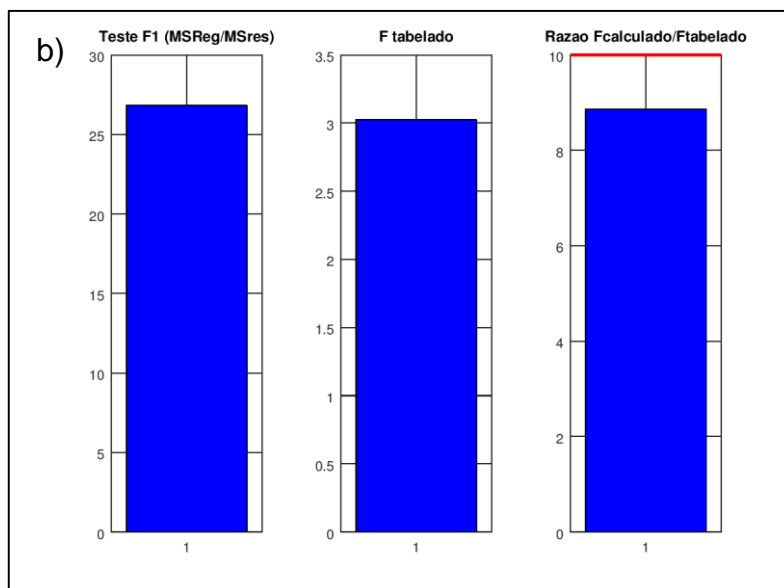
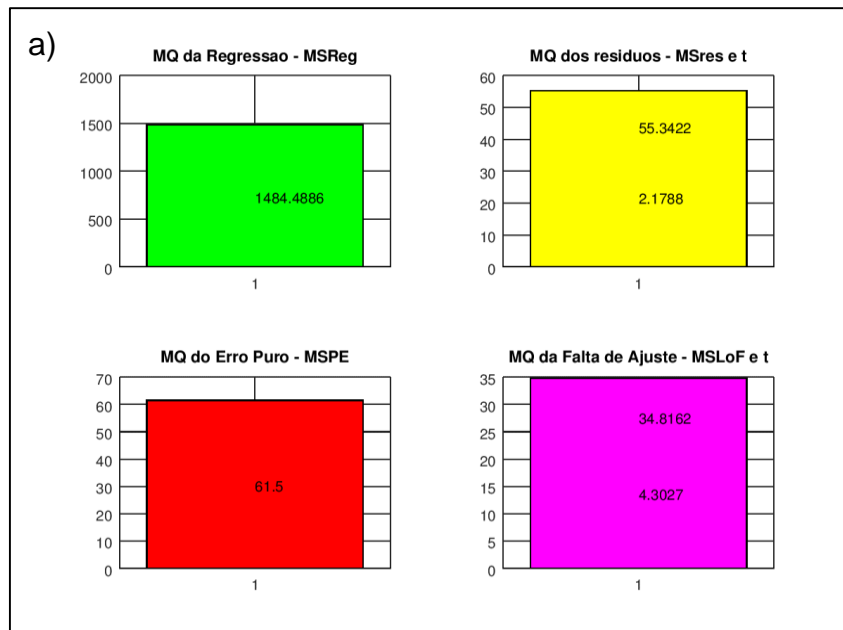
Experimentos	Agitação		pH		Rendimento do extrato LP164 (mg)
	Codificado	Real (rpm)	Codificado	Real	
1	-1	120	-1	5	33,2
2	-1	120	-1	5	27,4
3	1	180	-1	5	46,3
4	1	180	-1	5	56,2
5	-1	120	1	8	51,5
6	-1	120	1	8	65,4
7	1	180	1	8	74,2
8	1	180	1	8	104,1

9	0	150	0	6	66,9
10	0	150	0	6	65,2
11	0	150	0	6	66,3
12	-1,41	108	0	6,5	45,3
13	-1,41	108	0	6,5	47,5
14	0	150	-1,41	4,3	29,8
15	0	150	-1,41	4,3	30,9
16	1,41	192	0	6,5	89,3
17	1,41	192	0	6,5	88,4
18	0	150	1,41	8,6	63,2
19	0	150	1,41	8,6	64,6

Nesse planejamento composto central foram organizados os experimentos (experimentos de 1 a 8) com as variáveis normalizadas entre -1 e 1. Os experimentos de 9 a 11 mostram 3 réplicas no ponto central (variáveis normalizadas em 0). Já os experimentos de 12 a 19 representam os pontos axiais, normalizados entre -1,41 e 1,41.

Com os experimentos da Tabela 16, foi possível calcular um modelo com 6 coeficientes: b_0 (constante), b_1 , b_2 (lineares), b_{11} , b_{22} (quadráticos) e b_{12} (interação). Para efetuar os cálculos dos coeficientes de regressão e da Tabela Anova (*Analysis of Variance*), foi utilizada a função “regression2” (PEREIRA et al., 2018). Na Figura 18 são mostrados 4 gráficos que foram gerados a partir da rotina “regression2”. O primeiro gráfico mostrou (Figura 18a) as médias quadráticas da regressão (MSReg, coluna verde), resíduo (MSres, coluna amarela), erro puro (MSPE, coluna vermelha) e falta de ajuste (MSLoF), coluna rosa). Os números inseridos nas colunas da Figura 18a mostram os valores das médias quadráticas. No caso específico da MSres e MSLoF são também mostrados os valores de t tabelado com 95% de confiança. Os resultados desejáveis é que MSReg seja superior que a MSres, onde a razão ideal entre estas duas médias quadráticas (MSReg/MSres) devem ser altos para afirmar que o modelo possui uma adequada condição estatística, permitindo a sua utilização para realizar previsões (BARROS NETO et al., 2010). O cálculo desta razão representa a variância do modelo, em que os valores de $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} são comparados. O segundo gráfico da Figura 18 para a linhagem *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b mostrou esses resultados por meio das colunas azuis (Figura 18b) onde o valor de F foi da ordem de 25 e o valor de F_{tabelado} com

5 (MSReg) e 5 (MSres) graus de liberdade foi 3,05 com 95% de confiança. A terceira coluna azul mostrou a razão entre os valores de $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ de aproximadamente 10, estando próximo ao valor ideal de 10.



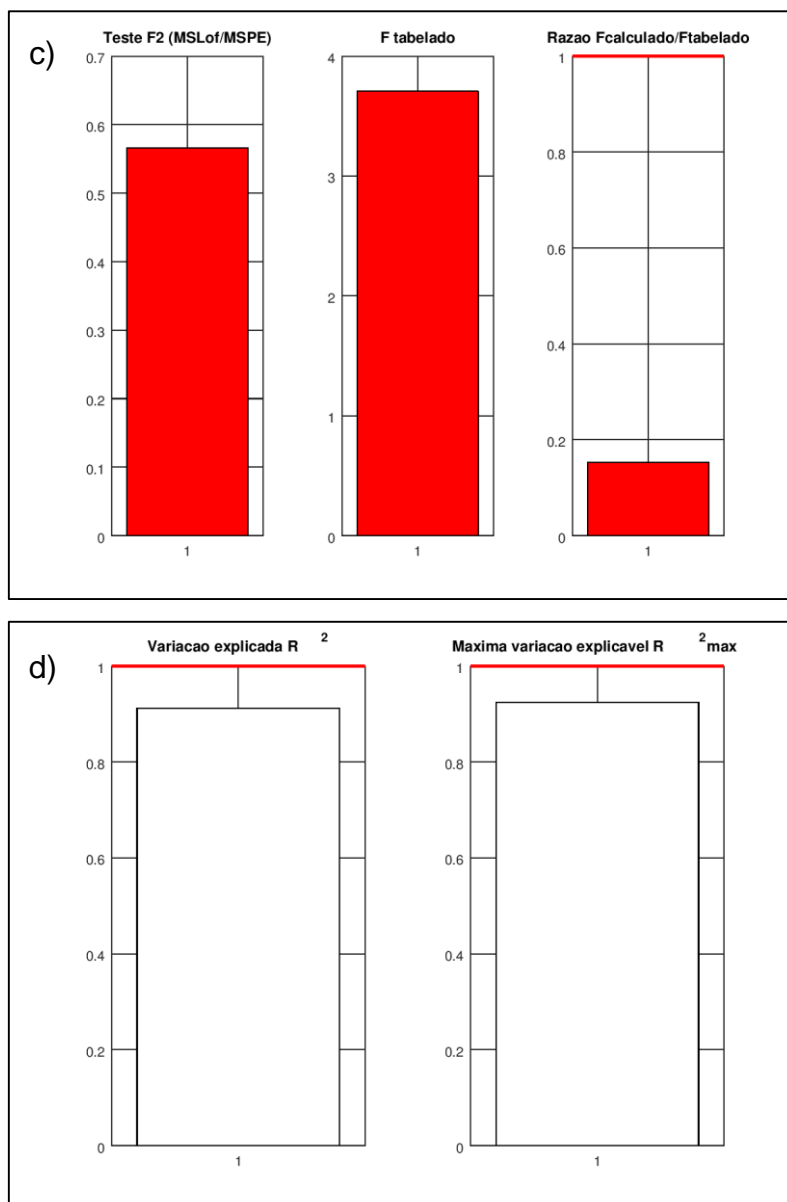


Figura 18. Gráficos dos valores de médias quadráticas (a) teste F para MSReg e MSres (b), teste F para MSLoF e MSPE (c) e variação explicada (R^2) e (d) explicável (R^2_{max}) para *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164).

Entretanto, para verificar se o mesmo apresentou ou não falta de ajuste, dividimos a MSLoF pela MSPE e foi obtido um valor de $F_{calculado}$ da ordem de 0,5, observado no gráfico com colunas vermelhas da Figura 18c, no qual também mostrou o valor do $F_{tabelado}$ (na ordem de 3) e a razão entre ambos. Foi possível notar que o valor calculado foi inferior ao tabelado com 95% de confiança. Esse gráfico mostrou também que o modelo calculado não apresentou falta de ajuste, pois os valores de MSLoF e MSPE se confundem estatisticamente ($F_{calculado} < F_{tabelado}$). A terceira coluna vermelha mostrou a razão

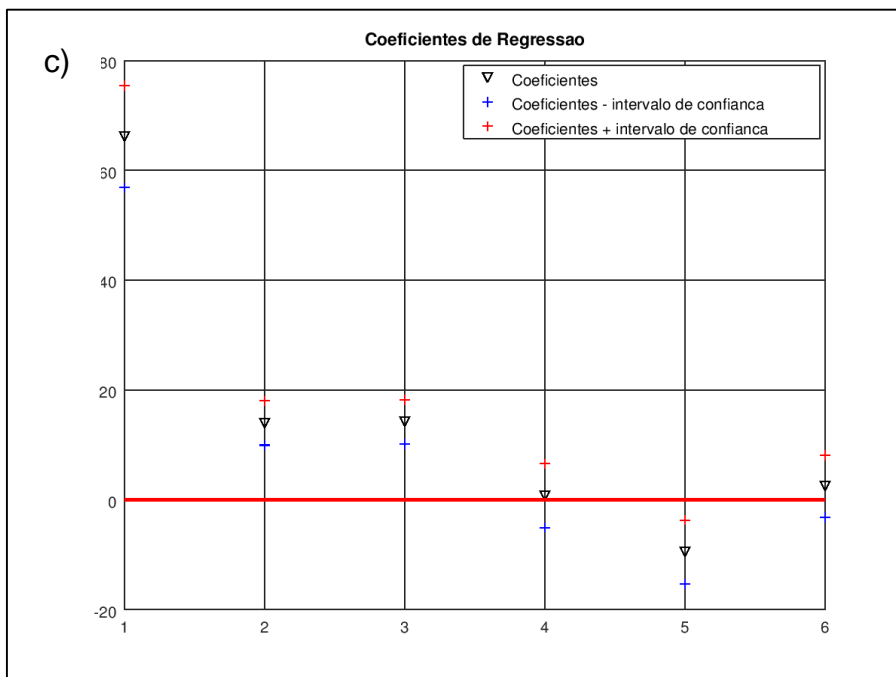
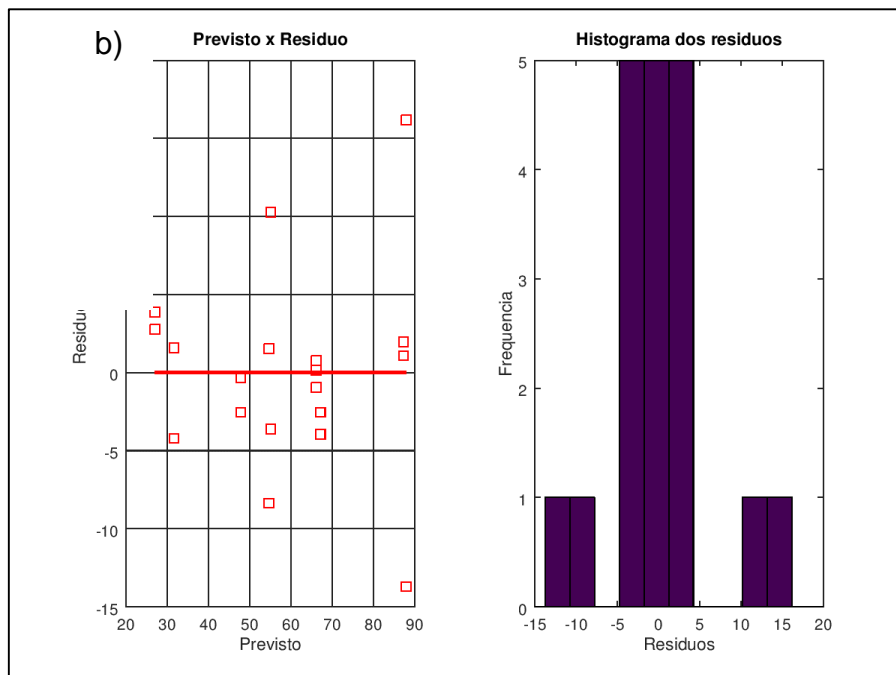


Figura 19. Gráfico dos valores experimental versus previsto (a), previsto versus resíduo e histograma dos resíduos (b) e coeficiente de regressão (c) para *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164).

O primeiro gráfico (Figura 19a) mostra a resposta experimental *versus* o previsto. Neste caso são calculados os valores quando os coeficientes são

somados (+ azul) e subtraídos (+ vermelho) com os intervalo de confiança, respectivamente.

No segundo gráfico (Figura 19b) mostra os valores previstos *versus* o resíduo e o histograma dos resíduos. Os valores dos resíduos são apresentados como positivos e negativos, separados por uma linha horizontal no zero. O ideal é que os resíduos estejam distribuídos de forma aleatória ou seja, homocedásticos e próximos de zero (PEREIRA et al., 2018), sendo, portanto, o observado neste experimento, onde não é observado anormalidades na distribuição dos resíduos.

E por fim, o último gráfico da Figura 19 mostrou os coeficientes de regressão (Figura 19c) calculados (triângulos invertidos) e o intervalo de confiança (sinais de + nas cores azul e vermelho). Obsevou-se que o intervalo de confiança para o quarto e sexto coeficientes (b_{11} e b_{12} , respectivamente), compreenderam o valor zero, sendo considerados não significativos ao nível de confiança de 95%. Logo, foi necessário recalculer o modelo (LEONARDI, et al, 2008) utilizando apenas os coeficientes válidos. A partir dos dados recalculados (Figura 20) observou-se que nenhum coeficiente foi insignificante e que o modelo obtido é eficaz para fazer previsões.

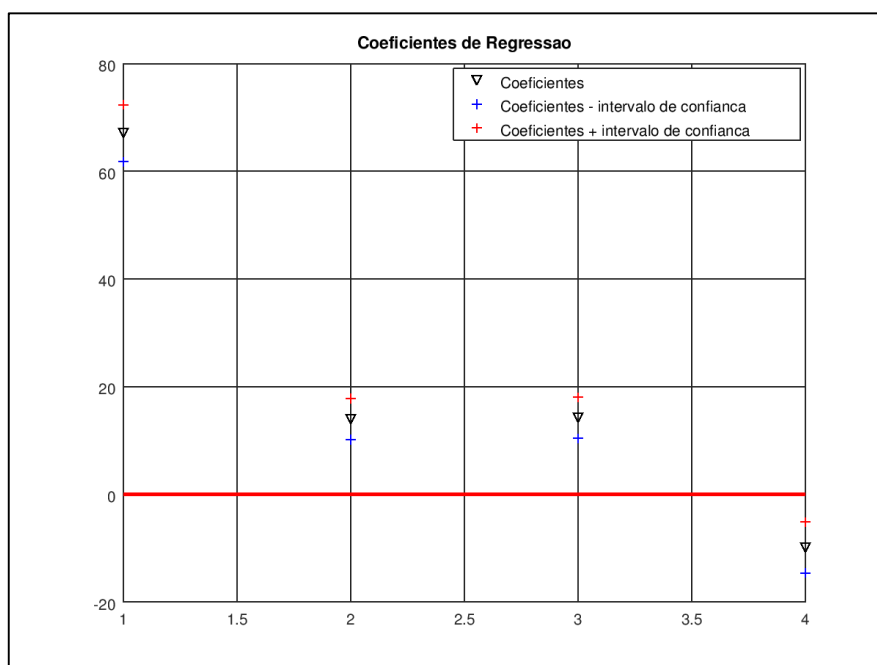
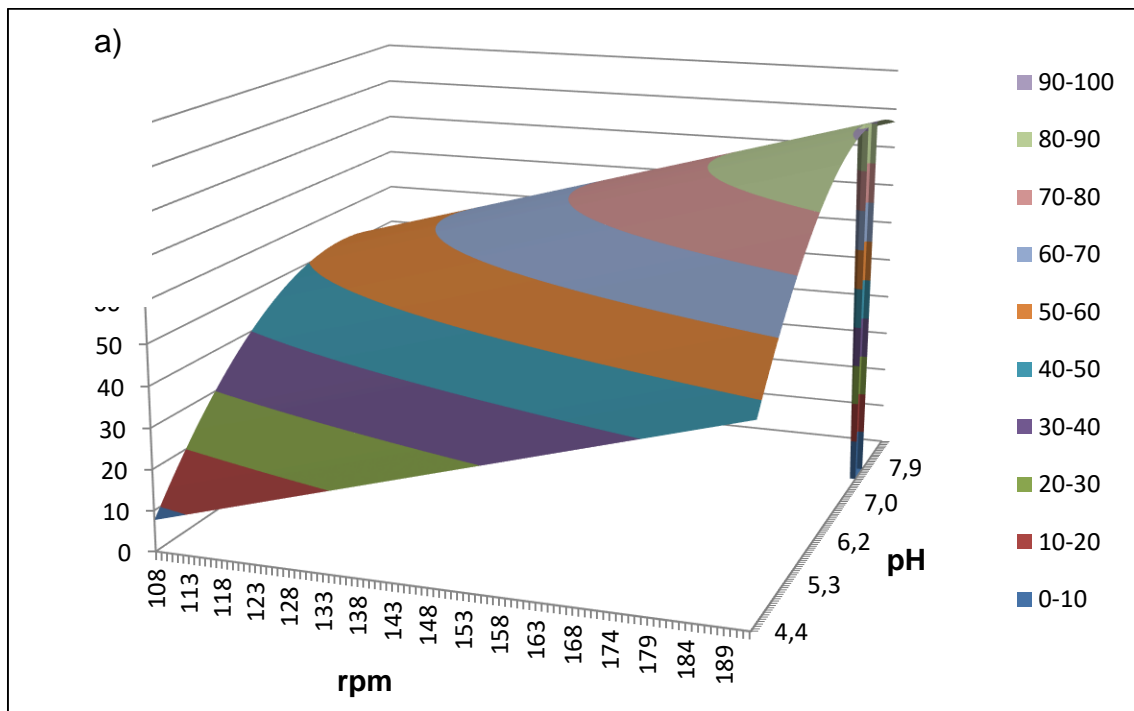


Figura 20. Gráfico dos coeficientes de regressão recalculados para *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164).

Com o modelo proposto, pôde-se visualizar na superfície de resposta gerada (Figura 21), (obtida no arquivo “template_superfície” do Excel), uma região de trabalho que permite obter maiores rendimentos na produção de lipopeptídeos por *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164). Nos gráficos da Figura 21 observou-se que a região máxima de resposta para a variável de pH, foi de 7,6 e para a variável de agitação, o máximo foi de 190 rpm.



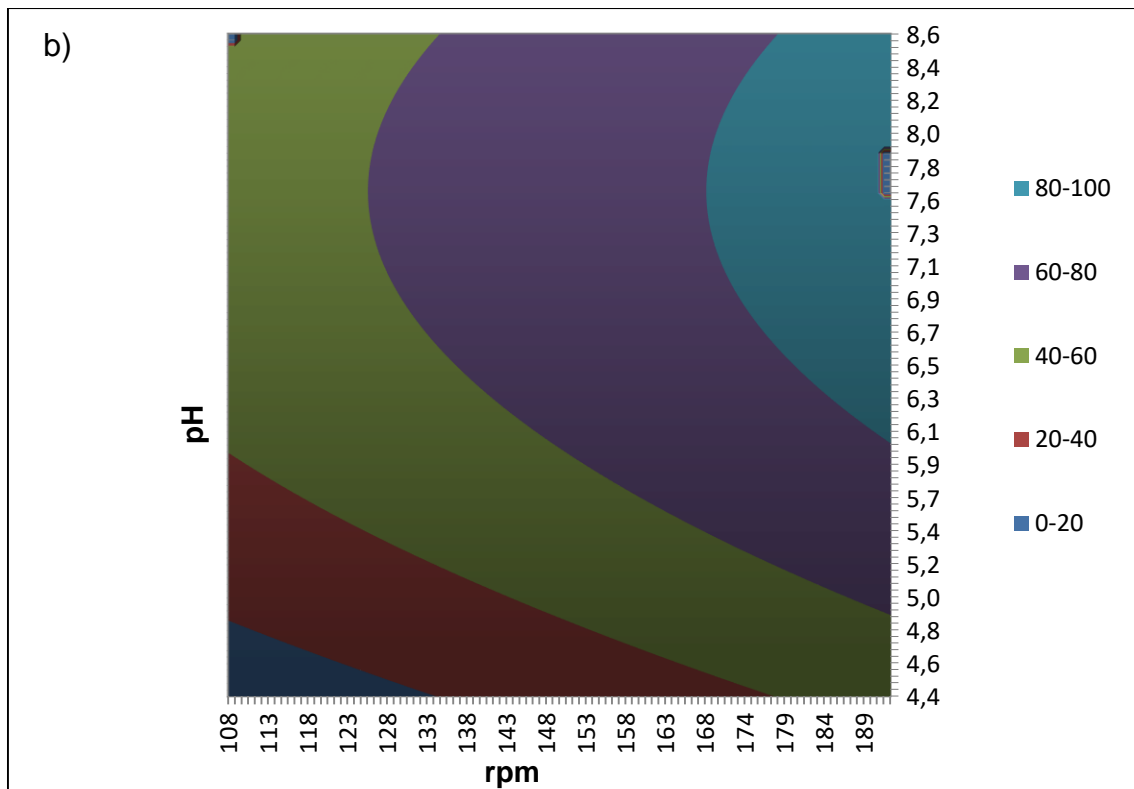


Figura 21. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para o modelo gerado para *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164).

5.3.2 Otimização para a linhagem *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50).

A Tabela 17 mostra os experimentos efetuados e a resposta para o rendimento dos extratos lipopeptídicos para a linhagem *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50). Novamente com os 11 experimentos executados foi possível calcular 7 contrastes (C): 1+234 (C1), 2+134 (C2), 3+124 (C3), 4+123 (C4), 12+34 (C5), 13+24 (C6) e 14+23 (C7).

Tabela 17. Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para verificar a influência de 4 variáveis (v1 a v4) no rendimento da produção de lipopeptídeos de *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50).

Experimentos	Agitação (v1)		Temperatura (v2)		pH (v3)		Aeração (v4)		Rendimento do extrato LP50 (mg)
	Codificado	Real (rpm)	Codificado	Real (°C)	Codificado	Real	Codificado	Real	
1	-1	120	-1	26	-1	5	-1	0,36	10,8
2	-1	120	-1	26	1	8	1	0,72	88,2
3	-1	120	1	34	-1	5	1	0,72	31,1
4	-1	120	1	34	1	8	-1	0,36	45,8
5	1	180	-1	26	-1	5	1	0,72	20,8
6	1	180	-1	26	1	8	-1	0,36	37,3
7	1	180	1	34	-1	5	-1	0,36	21,1
8	1	180	1	34	1	8	1	0,72	66,2
9	0	150	0	30	0	6	0	0,60	50,4
10	0	150	0	30	0	6	0	0,60	51,1
11	0	150	0	30	0	6	0	0,60	50,8

No gráfico de probabilidade (Figura 22b) é notato que os efeitos 3 (relativo à variável 3) e 4 (relativo à variável 4) estão distantes do intervalo de confiança dos efeitos, delimitados pelas duas linhas verticais vermelhas. Além disso, notou-se também que o efeito da variável 2 (identificado com o número 2 na Figura 22) e sua interação 12 (número 5) não é tão importante, estando localizada próxima ao zero no eixo x. Se observarmos no gráfico verificamos também que o efeito 1 (relativo a variável 1) e as interações 13 (número 6) e 14 (número 7) também se localizam próximo ao zero, sendo insignificantes para o modelo. Assim, as variáveis 1 e 2 foram removidas do planejamento fatorial, resultando então em novas réplicas e permitindo calcular um novo valor para o erro de um efeito.

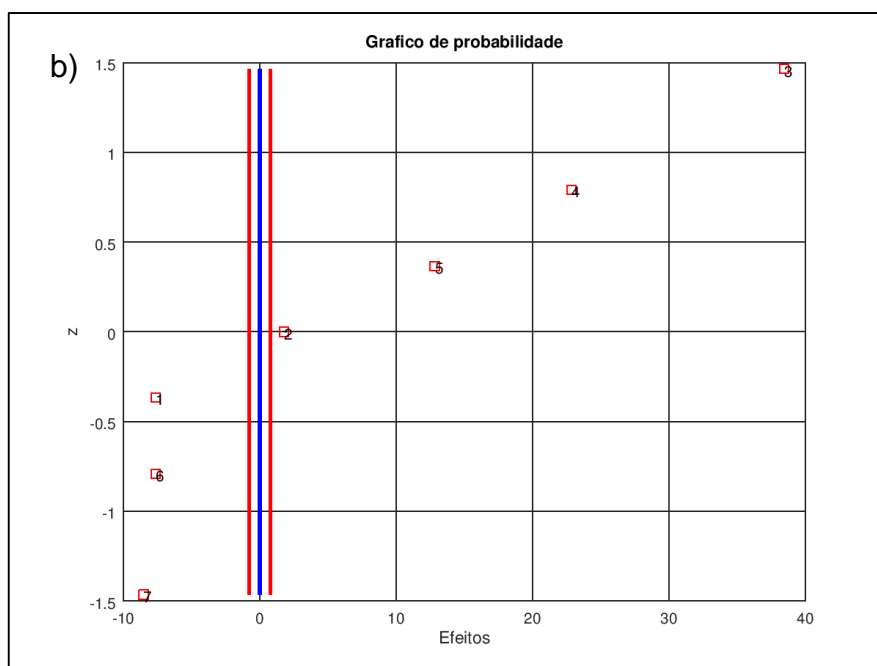
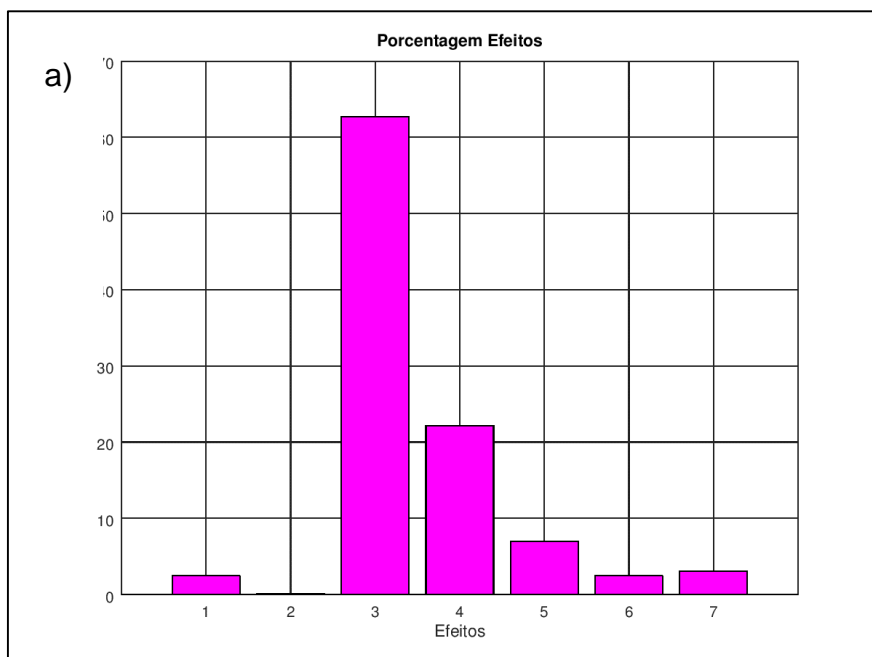


Figura 22. Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50).

Como conclusão para *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50), foi possível notar que para o aumento da produção de lipopeptídeos foi necessário, avaliar as condições experimentais das variáveis 3 e 4. Já as variáveis 1 e 2 foram inócuas para a faixa testada de 120 a 180 rpm e 26 a 34 °C respectivamente, podendo ser fixadas em qualquer condição dentro destes intervalos.

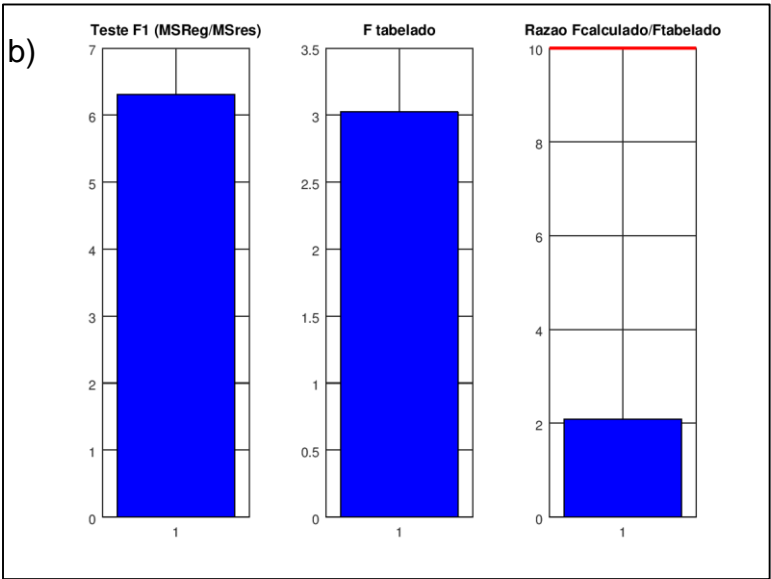
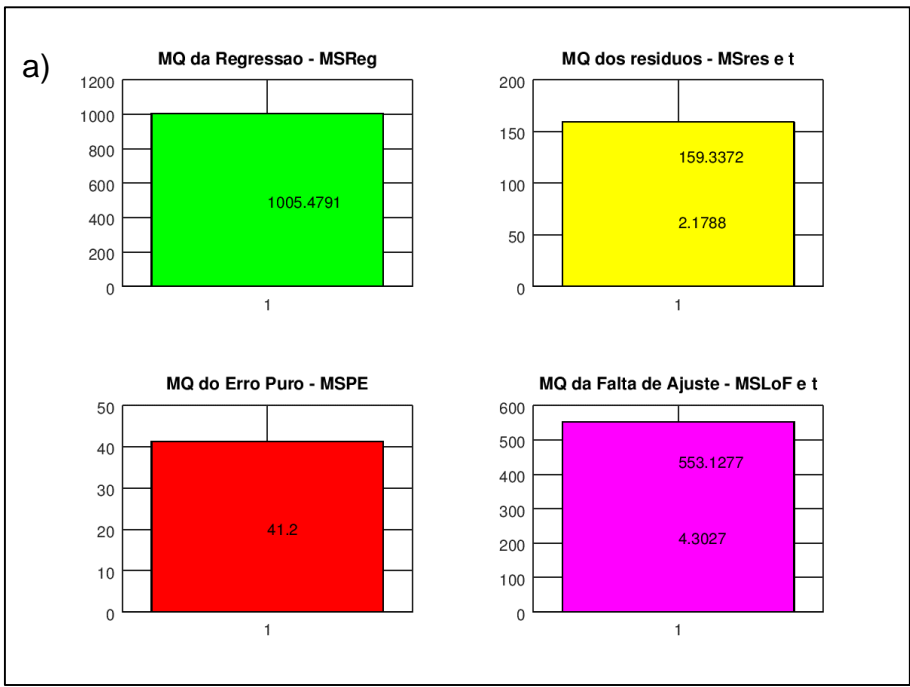
Visto que os resultados apontaram as variáveis de pH e aeração como sendo as mais importantes para *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50), passamos para o refinamento do modelo utilizando o planejamento composto central (PEREIRA FILHO, 2018; BARROS NETO, et al., 1996) no sentido de obter uma condição ótima de trabalho para esta linhagem.

A Tabela 18 mostra os experimentos efetuados, bem como os sinais monitorados para as variáveis em questão e as respostas obtidas.

Tabela 18. Condições experimentais do planejamento fatorial composto central realizado para *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50).

Experimentos	pH		Aeração		Rendimento do extrato LP50 (mg)
	Codificado	Real	Codificado	Real	
1	-1	5	-1	0,36	10,8
2	-1	5	-1	0,36	21,1
3	-1	5	1	0,72	20,8
4	-1	5	1	0,72	31,1
5	1	8	1	0,72	88,2
6	1	8	1	0,72	66,2
7	1	8	-1	0,36	37,3
8	1	8	-1	0,36	45,8
9	0	6	0	0,60	55,5
10	0	6	0	0,60	54,8
11	0	6	0	0,60	53,9
12	-1,41	4,3	0	0,60	48,4
13	-1,41	4,3	0	0,60	49,8
14	0	6,5	-1,41	0,30	31,1
15	0	6,5	-1,41	0,30	28,3
16	1,41	8,6	0	0,60	58,3
17	1,41	8,6	0	0,60	52,5
18	0	6,5	1,41	0,88	71,6
19	0	6,5	1,41	0,88	68,4

Na Figura 23 são mostrados os 4 gráficos que foram gerados a partir do cálculo da Anova para os dados experimentais (Tabela 18) de *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50). Os números inseridos nas colunas da Figura 23a mostram os valores das médias quadráticas (MSReg, MSres, MSPE, MSLof) e no caso específico da MQR e MQFaj são também mostrados os valores de t tabelado com 95% de confiança.



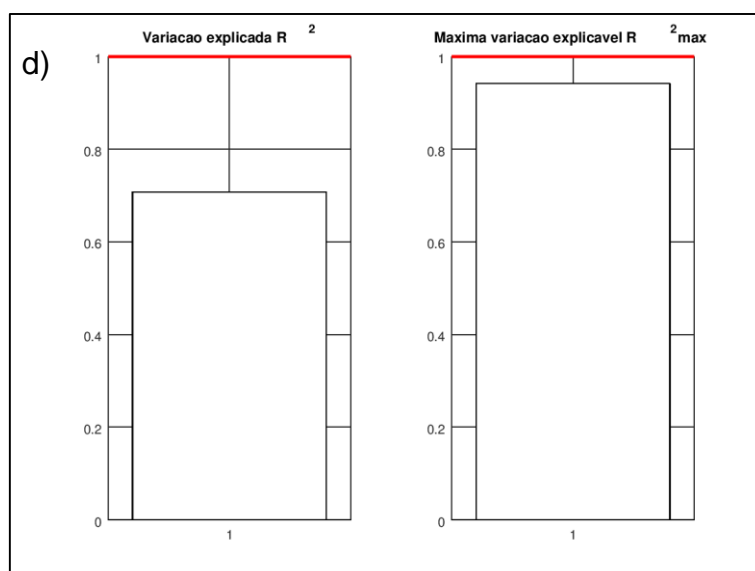
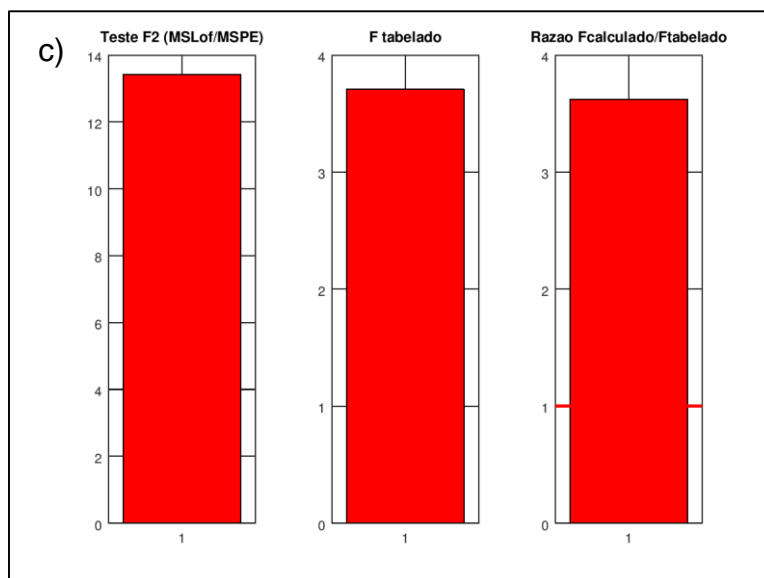
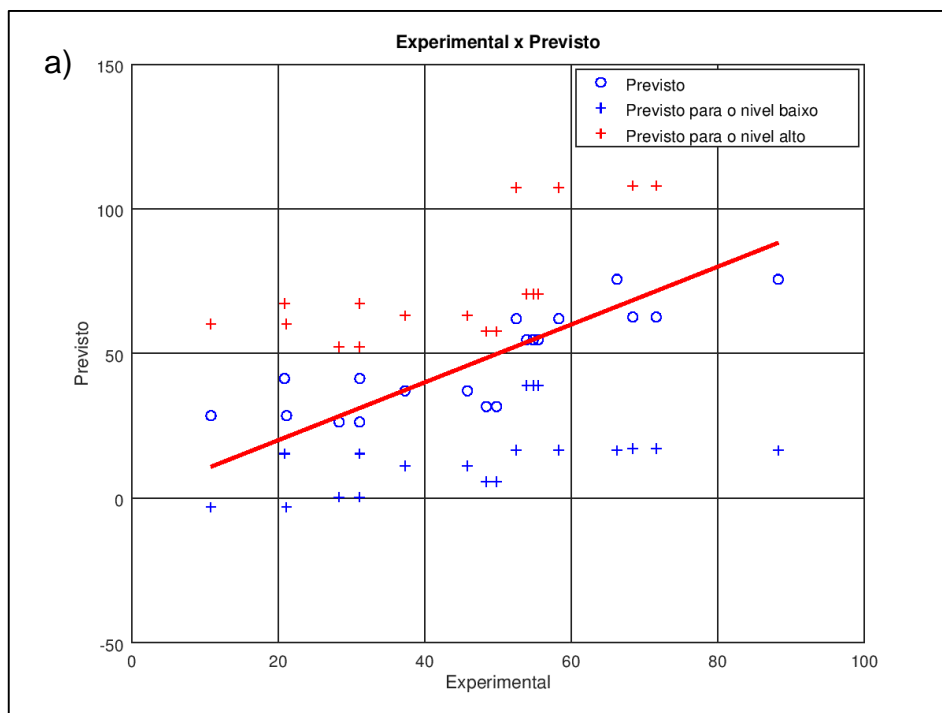


Figura 23. Gráficos dos valores de médias quadráticas (a) teste F para MSReg e MSres (b), teste F para MSLoF e MSPE (c) e variação explicada (R^2) e explicável (R^2_{max}) (d) para *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50).

A Figura 23b mostrou os cálculos da razão entre as médias quadráticas (MS_{Reg}/MS_{res}), em que os valores de $F_{calculado}$ e $F_{tabelado}$ são comparados para a linhagem *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50). O valor de $F_{calculado}$ foi da ordem de 6,2 e o valor de $F_{tabelado}$ com 5 (MS_{Reg}) e 5 (MS_{res}) graus de liberdade foi 3 com 95% de confiança. A terceira coluna azul mostrou a razão entre os valores de $F_{calculado}/F_{tabelado}$ de 2,05, apresentando um valor inferior ao desejável, uma vez que o ideal seria que esta razão fosse superior a 10. Foi verificado também se o modelo apresentou ou não falta de ajuste. Assim, ao dividir a

MSLoF pela MSPE foi obtido um valor de $F_{\text{calculado}}$ da ordem de 13, observado no gráfico com colunas vermelhas da Figura 23c, no qual também se observa o valor do F_{tabelado} (na ordem de 3,6) e a razão entre ambos. Foi possível notar que o valor do $F_{\text{calculado}}$ foi superior ao tabelado com 95% de confiança. Por esse gráfico, o modelo calculado apresentou uma pequena falta de ajuste, pois os valores de MSLoF e MSPE não se confundiram estatisticamente ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), com a razão entre os valores de F ($F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}=13/3,6$) superior a 1.

Por fim, os valores de variação explicada (R^2) e a máxima variação explicável (R^2_{max}) (Figura 23d), mostram-se próximos às linhas vermelhas horizontais que indicam o valor ideal de 1.



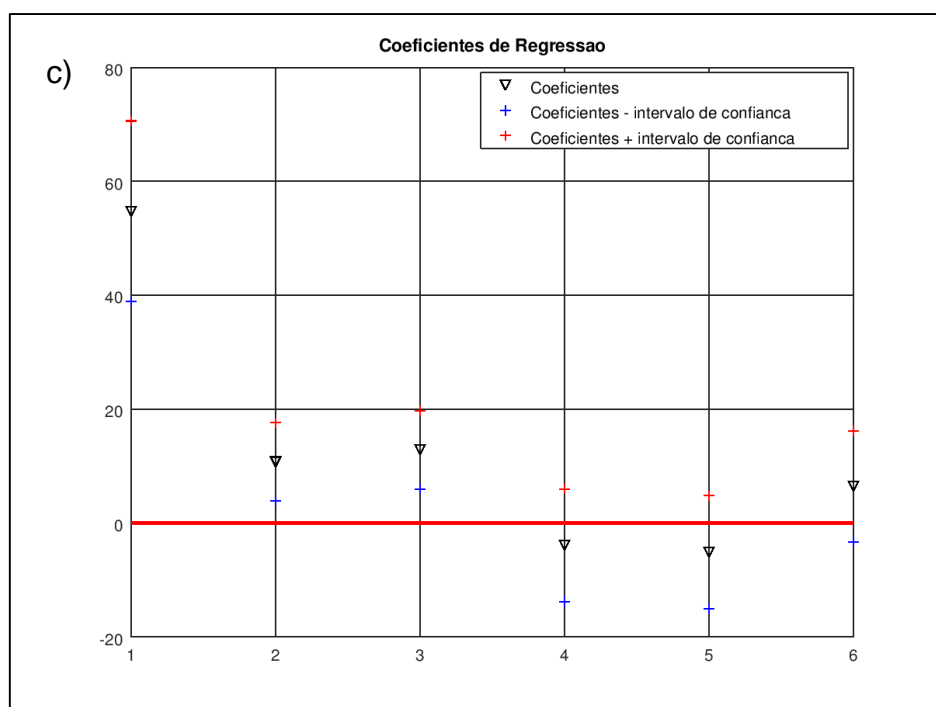
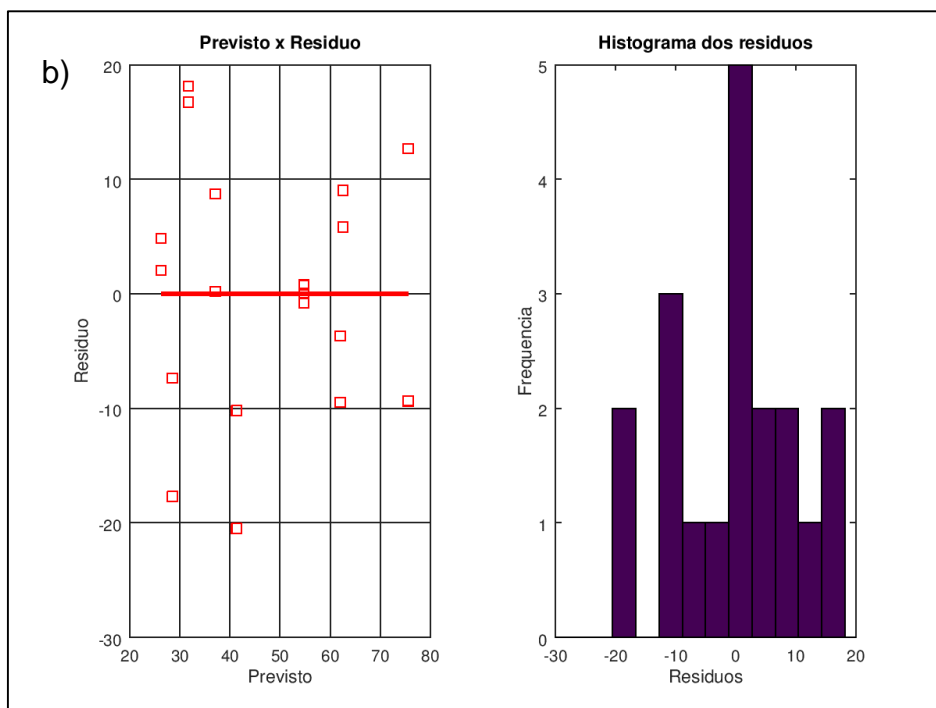


Figura 24. Gráfico dos valores experimental versus previsto (a), previsto versus resíduo e histograma dos resíduos (b) e coeficiente de regressão (c) para *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50).

Embora o modelo tenha apresentado uma pequena evidência de falta de ajuste, foi possível utilizar a MSres como variância para os 6 coeficientes calculados. E como resultado três gráficos foram gerados, que são apresentados na Figura 24.

O primeiro e o segundo gráfico (Figura 24a e Figura 24b) mostrou que os valores dos resíduos se encontram distribuídos de forma aleatória, e próximos de zero favorecendo o modelo (PEREIRA et al., 2018). Enquanto que, no gráfico da Figura 24c obsevou-se que o intervalo de confiança para o quarto, quinto e sexto coeficientes (b11, b22 e b12, respectivamente), compreenderam o valor zero, sendo considerados não significativos ao nível de confiança de 95%. Logo, foi necessário recalcular o modelo (LEONARDI et al., 2008) utilizando apenas os coeficientes válidos. A partir dos dados recalculados (Figura 25) observou-se que nenhum coeficiente foi insignificante e que o modelo obtido é eficaz para fazer previsões.

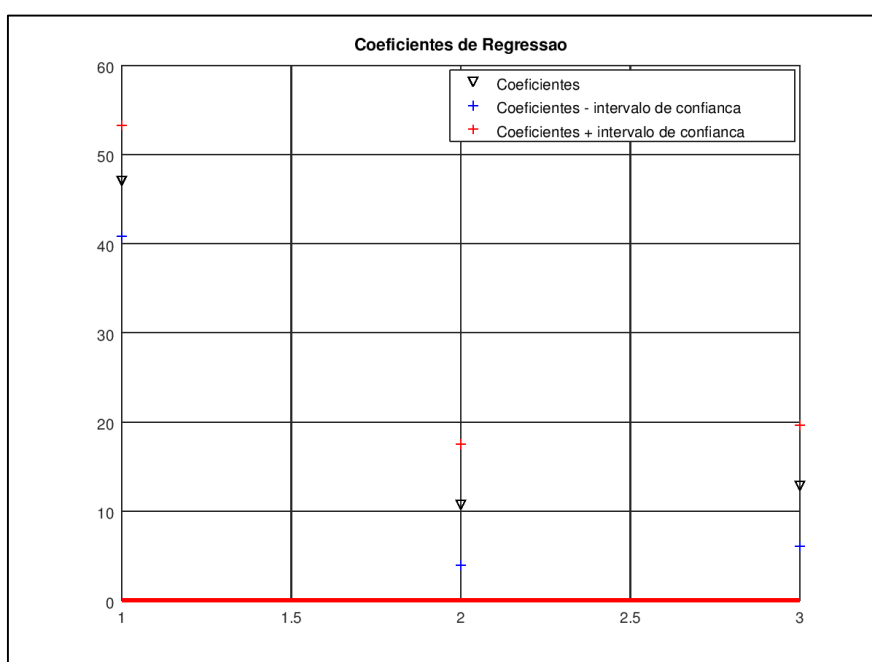


Figura 25. Gráfico dos coeficientes de regressão recalculados para *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50).

Com o modelo proposto, pôde-se visualizar na superfície de resposta gerada (Figura 26) (obtida no arquivo “template_superfície” do Excel), uma região de trabalho que permite obter maiores rendimentos na produção de lipopeptídeos por *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50). Nos gráficos da Figura 26 observou-se que a região máxima de resposta para a variável de pH, foi de 8,5 e para a variável de aeração, o máximo foi de 0,86.

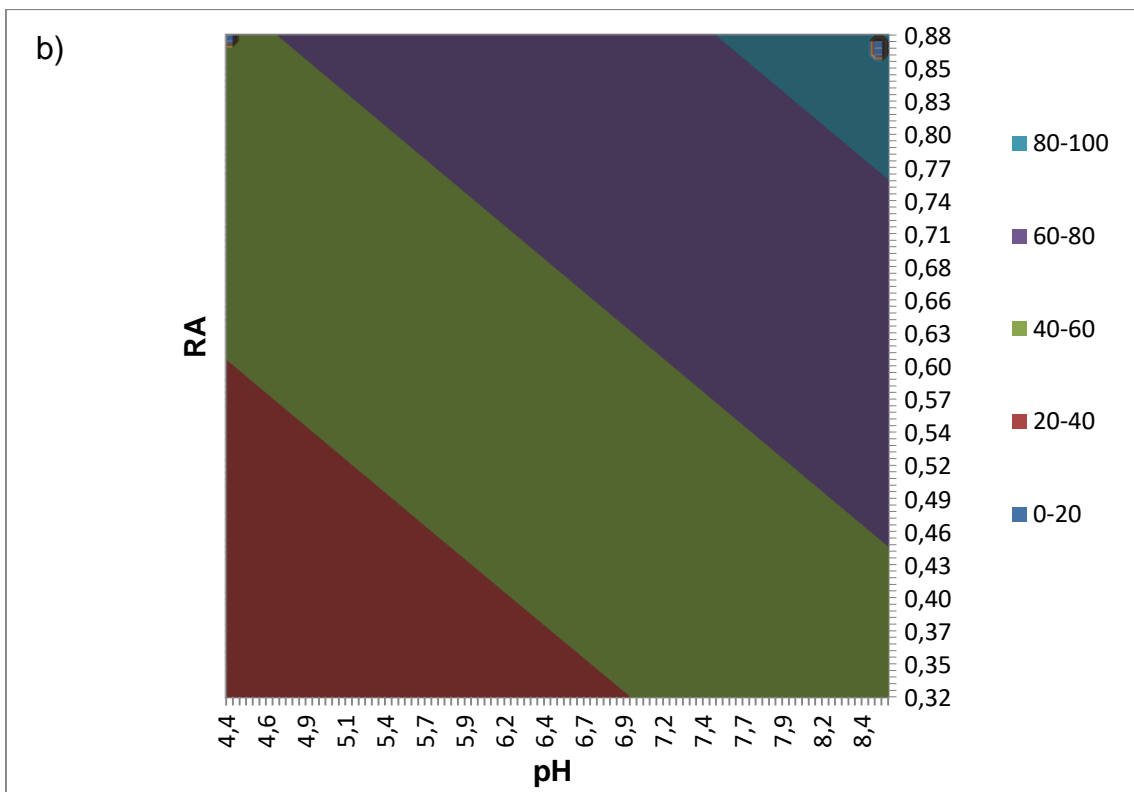
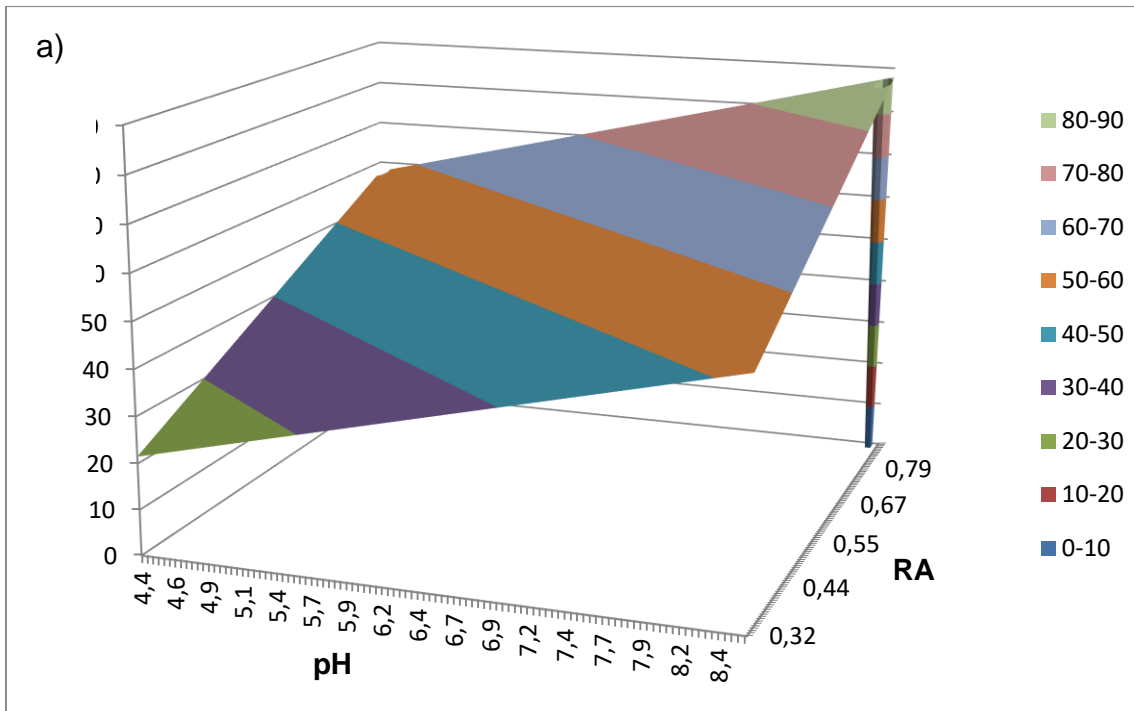


Figura 26. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para o modelo gerado para *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50).

5.3.2 Otimização para a linhagem *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196).

A Tabela 19 mostra os experimentos efetuados e a resposta para o rendimento dos extratos lipopeptídicos para *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196). Com os 11 experimentos executados foi possível calcular 7 contrastes (C): 1+234 (C1), 2+134 (C2), 3+124 (C3), 4+123 (C4), 12+34 (C5), 13+24 (C6) e 14+23 (C7).

Tabela 19. Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para verificar a influência de 4 variáveis (v1 a v4) no rendimento da produção de lipopeptídeos de *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196).

Experimentos	Agitação (v1)		Temperatura (v2)		pH (v3)		Aeração (v4)		Rendimento do extrato LP196 (mg)
	Codificado	Real (rpm)	Codificado	Real (°C)	Codificado	Real	Codificado	Real	
1	-1	120	-1	26	-1	5	-1	0,36	25,2
2	-1	120	-1	26	1	8	1	0,72	70,0
3	-1	120	1	34	-1	5	1	0,72	26,1
4	-1	120	1	34	1	8	-1	0,36	55,8
5	1	180	-1	26	-1	5	1	0,72	52,4
6	1	180	-1	26	1	8	-1	0,36	63,2
7	1	180	1	34	-1	5	-1	0,36	44,5
8	1	180	1	34	1	8	1	0,72	56,5
9	0	150	0	30	0	6	0	0,60	63,2
10	0	150	0	30	0	6	0	0,60	60,6
11	0	150	0	30	0	6	0	0,60	61,1

Utilizando a ferramenta do Octave, construiu-se o gráfico de porcentagem (Figura 27a) e o gráfico de probabilidade (Figura 27b).

Os gráficos da Figura 27 mostraram que os contrastes mais importantes foram os efeitos 3 (relativo à variável 3), 1 (relativo à variável 1) e 6 (relativo a interação 13). Além disso, notou-se também que o efeito da variável 2 (identificado com o número 2 na Figura 27) e 4 (número 4) e suas interações 12 (número 5) e 14 (número 7) respectivamente, não são tão importantes, estando localizados próximos ao zero no eixo x. Assim, as variáveis 2 e 4 foram removidas do planejamento fatorial, resultando então em novas réplicas e permitindo calcular um novo valor para o erro de um efeito.

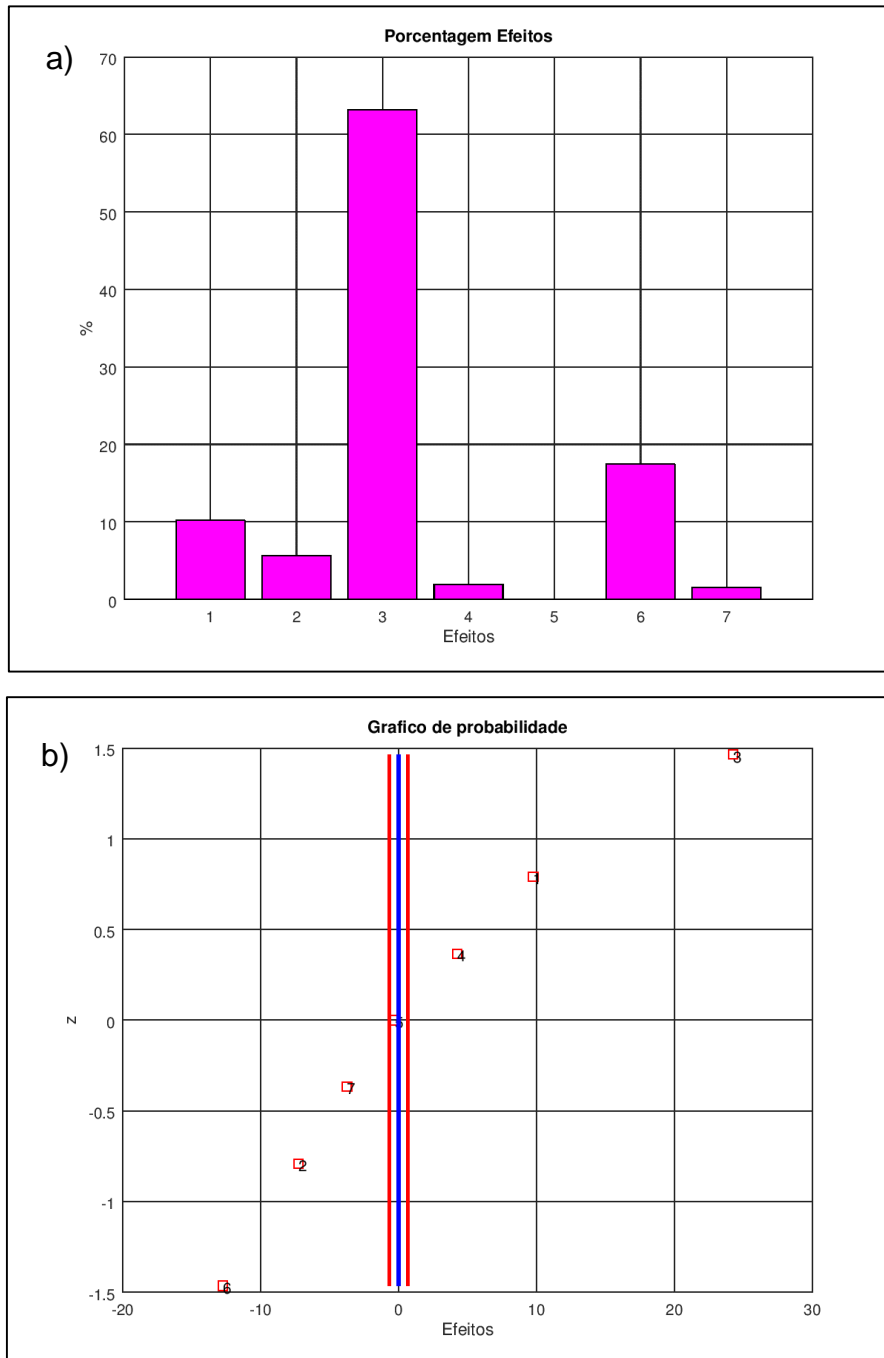


Figura 27. Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196).

Como conclusão para *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196), foi possível notar que para o aumento da produção de lipopeptídeos foi necessário, avaliar as condições experimentais das variáveis 1 e 3. Já as variáveis 2 e 4 foram inócuas para a faixa testada de 26 a 34 °C e 0,36 a 0,72 (90 a 180 mL)

respectivamente, podendo ser fixadas em qualquer condição dentro destes intervalos.

Visto que os resultados apontaram as variáveis de agitação e pH como sendo as mais importantes para *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196), passamos para o refinamento do modelo utilizando o planejamento composto central (PEREIRA FILHO, 2018; BARROS NETO et al., 1996) no sentido de obter uma condição ótima de trabalho para esta linhagem.

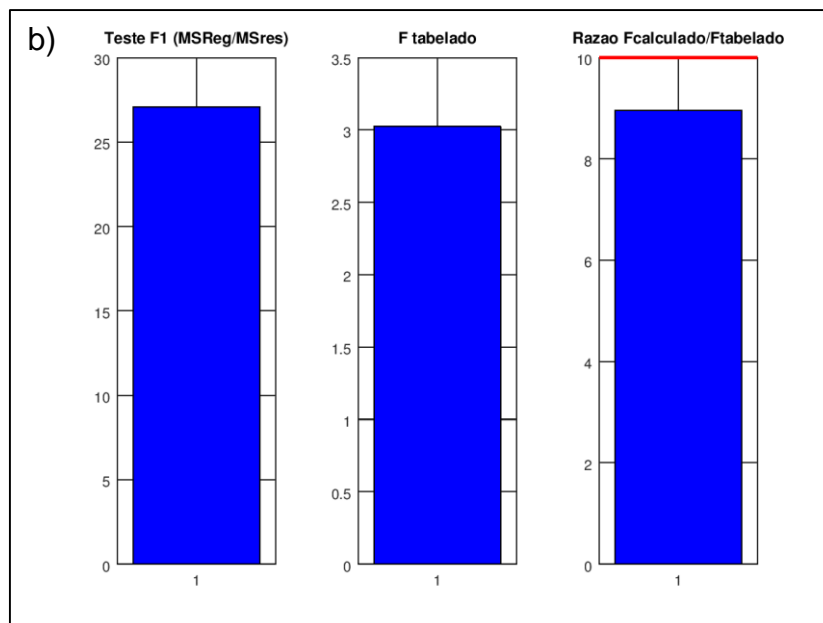
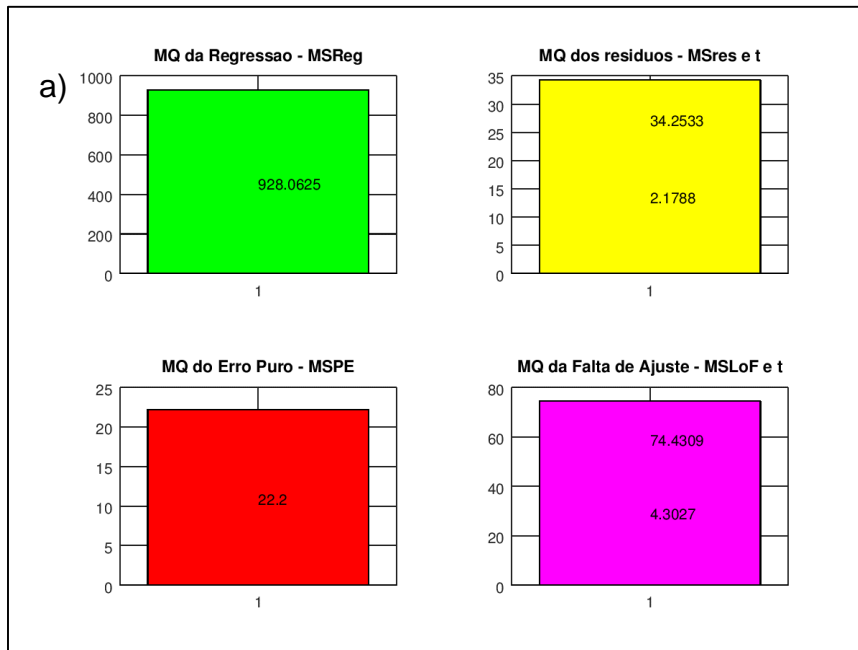
A tabela 20 mostra os experimentos efetuados, bem como os sinais monitorados para as variáveis em questão e as respostas obtidas.

Tabela 20. Condições experimentais do planejamento fatorial composto central realizado para *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196).

Experimentos	Agitação		pH		Rendimento do extrato LP196 (mg)
	Codificado	Real (rpm)	Codificado	Real	
1	-1	120	-1	5	25,2
2	-1	120	-1	5	26,1
3	1	180	-1	5	52,4
4	1	180	-1	5	44,5
5	-1	120	1	8	70,0
6	-1	120	1	8	55,8
7	1	180	1	8	63,2
8	1	180	1	8	56,5
9	0	150	0	6	63,2
10	0	150	0	6	60,6
11	0	150	0	6	61,1
12	-1,41	108	0	6,5	28,4
13	-1,41	108	0	6,5	31,2
14	0	150	-1,41	4,3	62,9
15	0	150	-1,41	4,3	60,5
16	1,41	192	0	6,5	36,3
17	1,41	192	0	6,5	39,7
18	0	150	1,41	8,6	82,0
19	0	150	1,41	8,6	71,9

Na Figura 28 são mostrados os 4 gráficos que foram gerados a partir do cálculo da Anova para os dados experimentais (Tabela 20) de *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196). Os números inseridos nas colunas da Figura 28a mostram os valores das médias quadráticas (MSReg, MSres, MSPE,

MSLoF) e no caso específico da MSRege MSLoFsão também mostrados os valores de t tabelado com 95% de confiança.



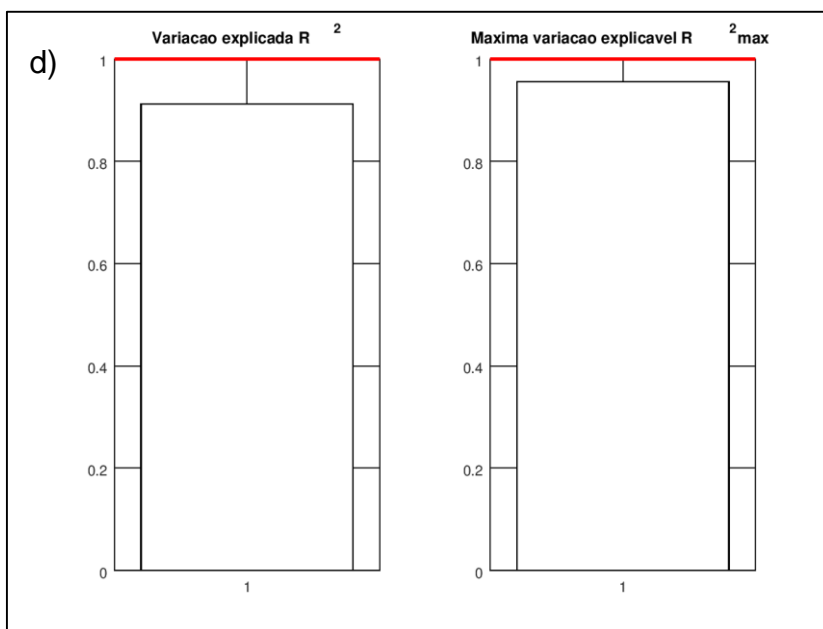
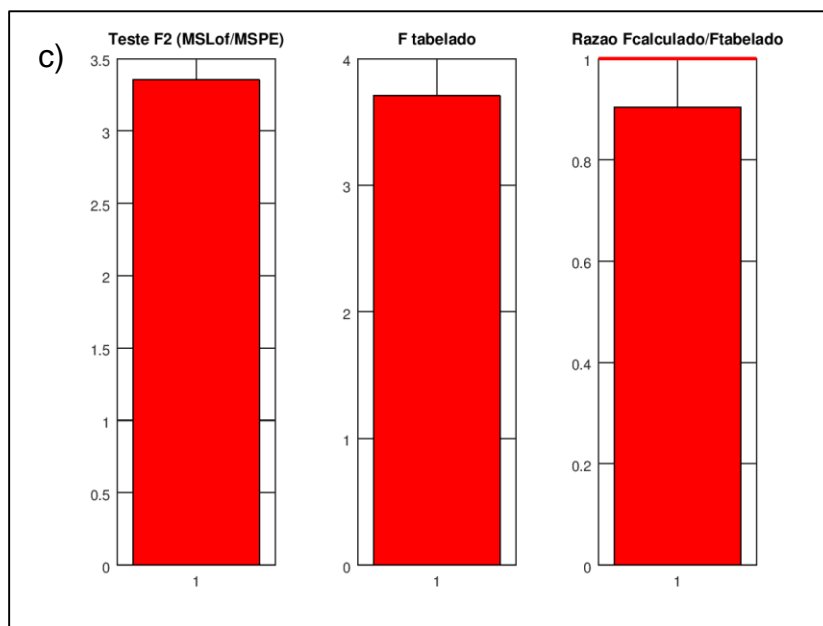
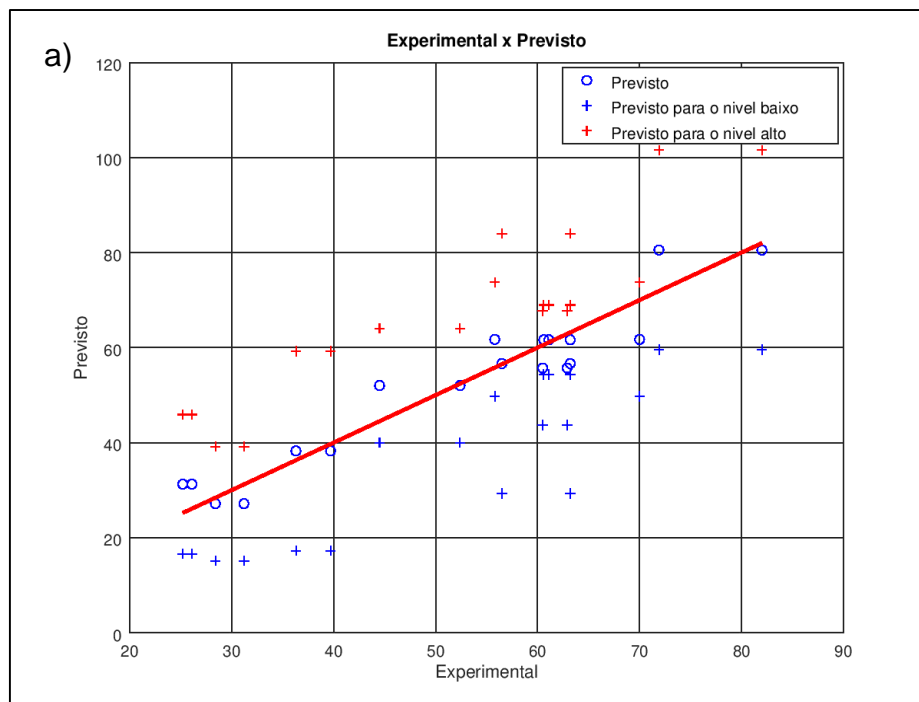


Figura 28. Gráficos dos valores de médias quadráticas (a) teste F para MSReg e MSres (b), teste F para MSLoF e MSPE (c) e variação explicada (R²) e explicável (R²_{max}) (d) para *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196).

A Figura 28b mostra os cálculos da razão entre as médias quadráticas (MSReg/MSres), em que os valores de Fcalculado e Ftabelado são comparados para a linhagem *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196), onde o valor de Fcalculado foi da ordem de 26 e o valor de F tabelado com 5 (MSReg) e 5 (MSres) graus de liberdade foi 3 com 95% de confiança. A terceira coluna azul mostrou a razão entre os valores de Fcalculado/Ftabelado de aproximadamente

10, estando próximo ao desejável. Em seguida o gráfico 28c, mostrou se o mesmo apresentou ou não falta de ajuste. Assim, ao dividir a MSLoF pela MSPE foi obtido um valor de $F_{\text{calculado}}$ da ordem de 3,4 observado no gráfico com colunas vermelhas (Figura 28c), no qual também mostrou o valor do F_{tabelado} (na ordem de 3,8) e a razão entre ambos. Foi possível notar que o valor calculado foi inferior ao tabelado com 95% de confiança. Esse gráfico mostrou também que o modelo calculado não apresentou falta de ajuste, pois os valores de MQFaJ e MSPE se confundiram estatisticamente ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$). A razão entre os valores de F ($F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}=3,4/3,8$), foi inferior a 1, semelhante ao valor ideal.

Por fim, os valores de variação explicada (R^2) e a máxima variação explicável (R^2_{max}) (PEREIRA FILHO, 2018) (Figura 28d), foram próximos às linhas vermelhas horizontais que indicaram o valor ideal de 1.



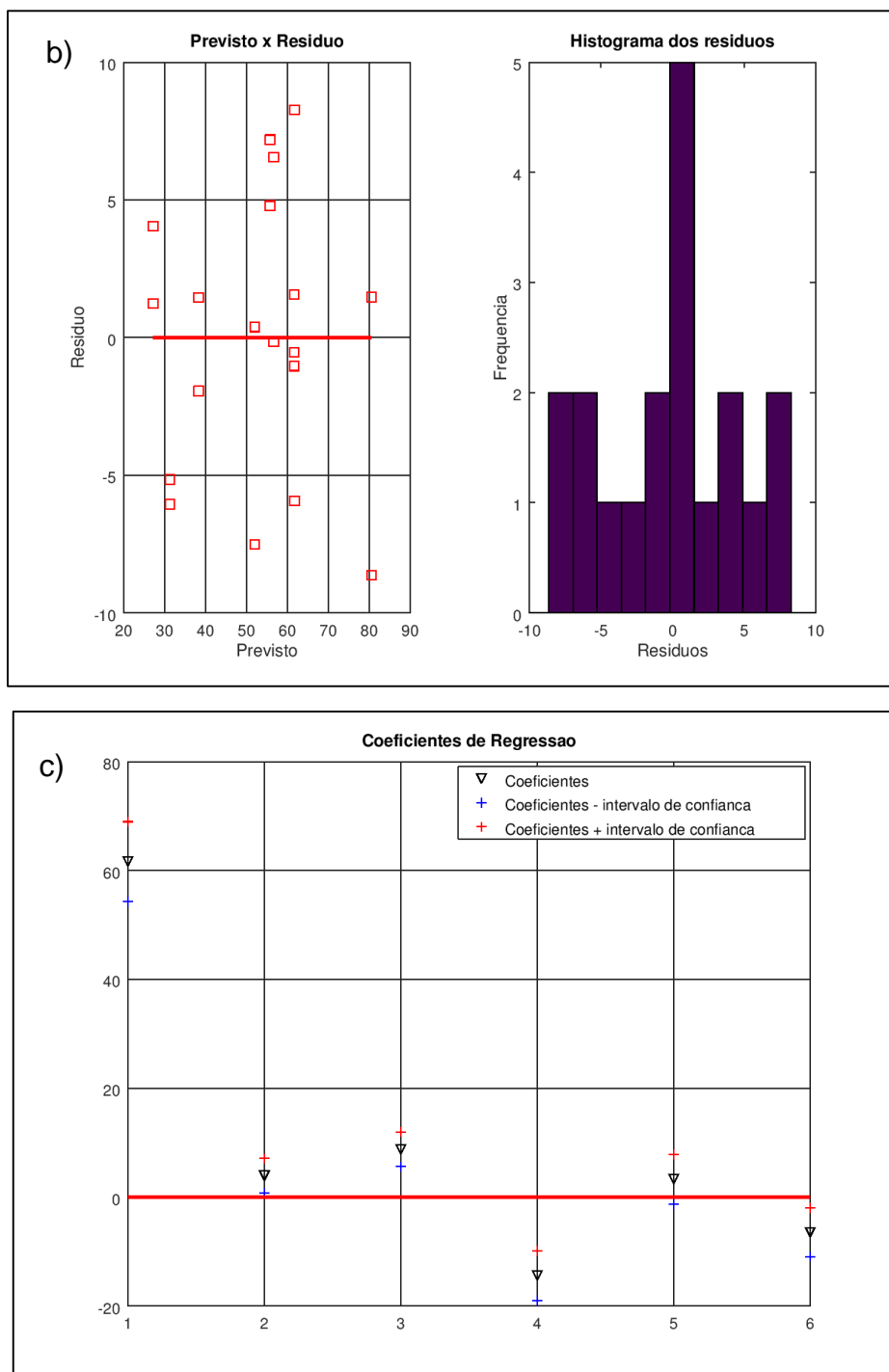


Figura 29. Gráfico dos valores experimental versus previsto (a), previsto versus resíduo e histograma dos resíduos (b) e coeficiente de regressão (c) para *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196).

Como o modelo calculado não apresentou evidência de falta de ajuste, foi possível utilizar a MSres como variância para os 6 coeficientes calculados. E como resultado três gráficos foram gerados, que são apresentados na Figura 29.

O primeiro e o segundo gráfico (Figura 29a e Figura 29b) mostrou que os valores dos resíduos se encontram distribuídos de forma aleatória, e próximos de zero favorecendo o modelo (PEREIRA et al., 2018). Enquanto que, no gráfico da Figura 29d o intervalo de confiança para o segundo e quinto coeficientes (b_1 e b_2 , respectivamente), compreenderam o valor zero sendo considerados não significativos ao nível de confiança de 95%. Logo, foi necessário recalculá-lo modelo (LEONARDI et al., 2008) utilizando apenas os coeficientes válidos. A partir dos dados recalculados (Figura 30) observou-se que nenhum coeficiente foi insignificante e que o modelo obtido é eficaz para fazer previsões.

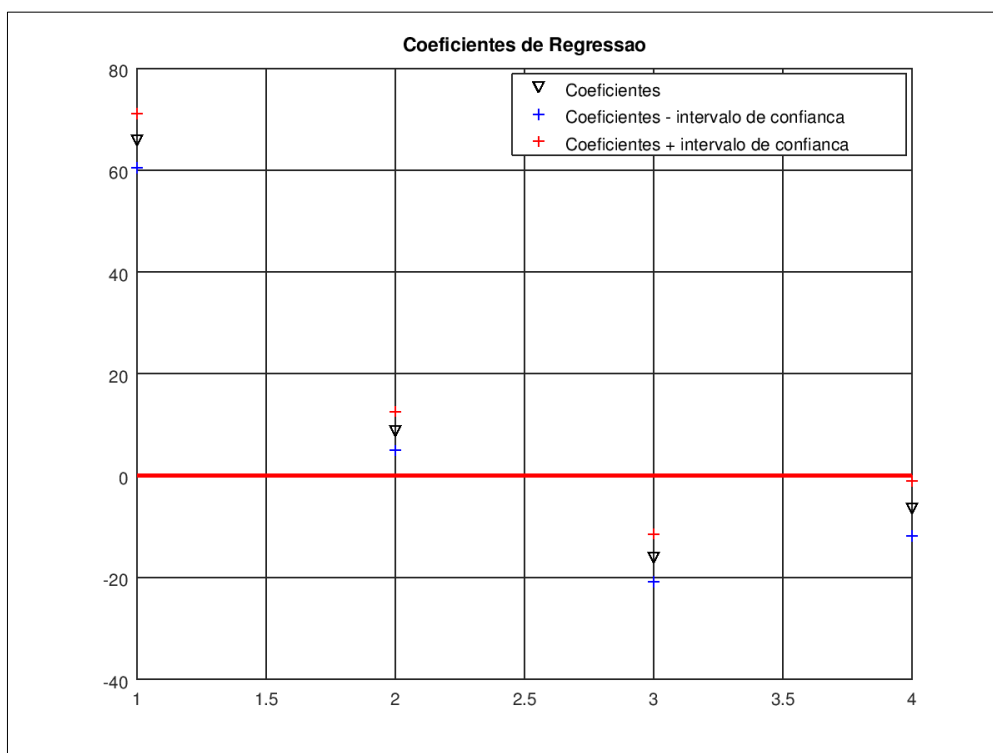


Figura 30. Gráfico dos coeficientes de regressão recalculados para *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196).

Com o modelo proposto, pôde-se visualizar na superfície de resposta gerada (Figura 31), obtida no arquivo “template_superfície” do Excel, uma região de trabalho que permite obter maiores rendimentos na produção de lipopeptídeos por *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196).

Nos gráficos da Figura 31 observou-se que a região máxima de resposta para a variável de agitação foi de 145 rpm e para a variável de pH o máximo foi de 8,5.

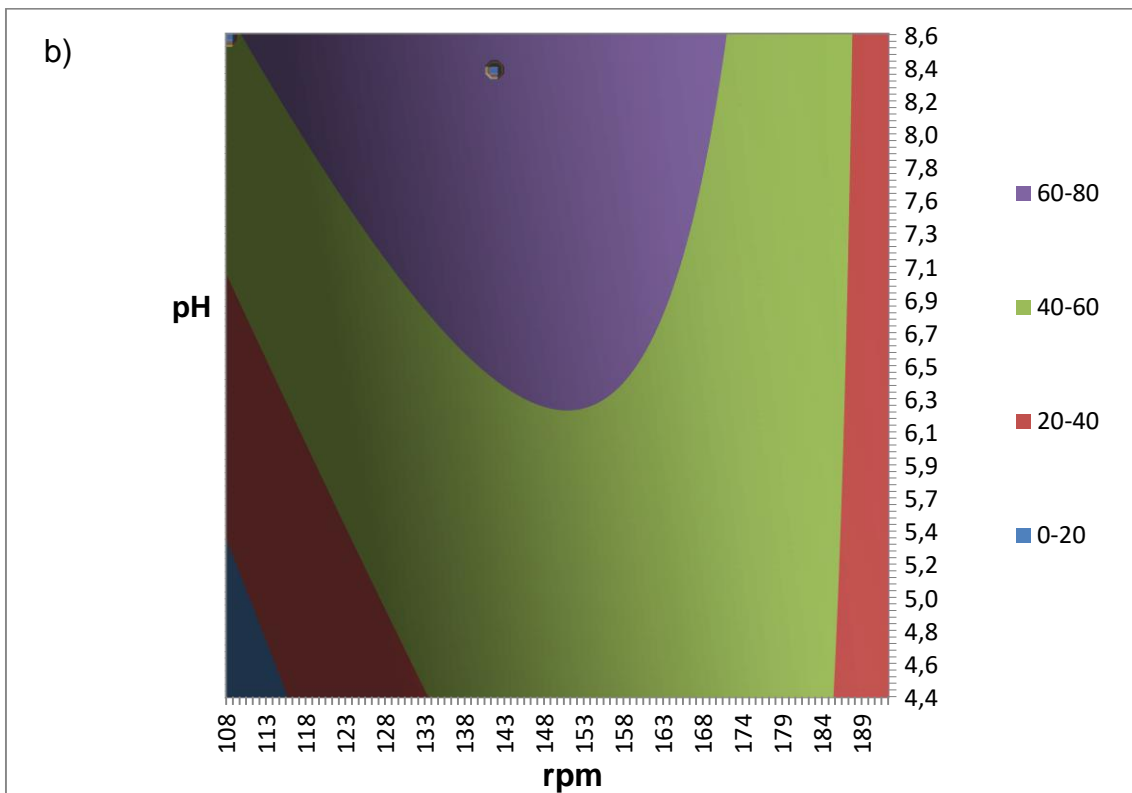
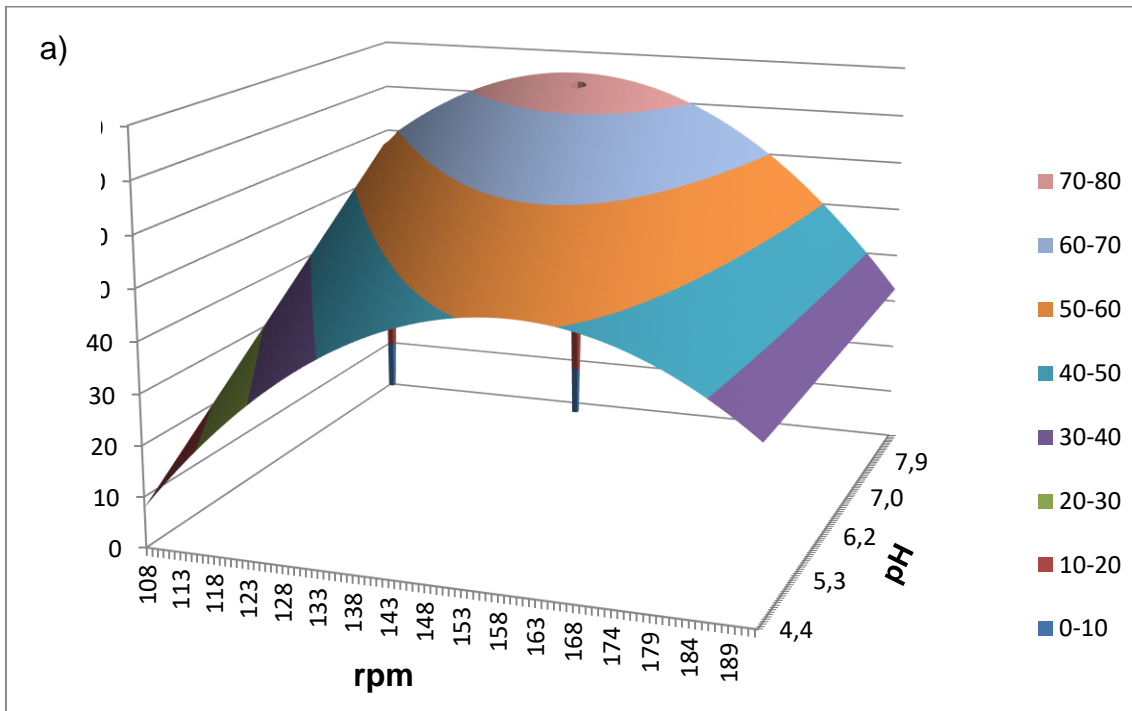


Figura 31. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para o modelo gerado para *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196).

A partir dos modelos gerados pela Anova para *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164), *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50) e *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196) os experimentos foram rearranjados e executados de acordo com a Tabela 21.

Tabela 21. Produção de lipopeptídeos a partir dos modelos gerados pela Anova para *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164), *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50) e *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196).

Experimentos					
Bactéria	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	pH	Aeração	Rendimento (mg.L ⁻¹)
<i>B. amyloliquefaciens</i> GhcC1 2.1a (LP50)	145	30	8,5	0,86	475,1
<i>B. amyloliquefaciens</i> PpC1 2.2b (LP164)	190	30	7,6	0,36	1466,3
<i>B. amyloliquefaciens</i> DgcR2 1.1b (LP196)	145	30	8,5	0,36	915,7

Os resultados padronizados pela Anova comparados com os dados experimentais sem a padronização (item 5.2), revelaram um aumento significativo no rendimento dos extratos lipopeptídicos para as linhagens de *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (de 633,1 mg.L⁻¹ para 1466,3 mg.L⁻¹) e *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (de 583,3 mg.L⁻¹ para 915,7 mg.L⁻¹). Este comportamento também é observado, porém em menor escala, para *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (de 352,8 mg.L⁻¹ para 475,1 mg.L⁻¹). Além disso, observou-se que a linhagem PpC1 2.2b apresentou o maior rendimento na produção de lipopeptídeos seguido das linhagens PpC1 2.2b e GhcC1 2.1a. Estes dados revelaram que as variações nas condições de cultivo das linhagens endofíticas utilizadas, interferiram na produção de lipopeptídeos. Onde os valores ótimos das variáveis de pH (7,6 e 8,6) e agitação (190 e 145 rpm) influenciaram na produção de lipopeptídeos das linhagens PpC1 2.2b e PpC1 2.2b, respectivamente e as variáveis pH (8,5) e aeração (0,86) contribuíram para o melhor rendimento de GhcC1 2.1a (Tabela 21).

Os resultados acima são coerentes com os relatos de vários estudos anteriores de que a escolha da linhagem e diferentes parâmetros operacionais de cultivo, como pH, condições nutricionais, temperatura, tempo de fermentação

e aeração influenciam no aumento da produção de lipopeptídeos (ABDEL-MAWGOUD, et al., 2008; JHA, et al., 2016; MEENA et al., 2018). São também coerentes com estudos realizados por Zhao e colaboradores (2012, 2015) utilizando *B. amyloliquefacies* para a produção de lipopeptídeos com variação da faixa de pH do meio, em que encontraram o maior rendimento na produção dos lipopeptídeos sob condições neutras e alcalina. Em condições ácidas relatam uma redução significativa, não havendo produção de lipopeptídeos abaixo de pH 5,0, o que de fato também ocorreu nas linhagens de *B. amyloliquefacies* avaliadas neste trabalho. Em outro trabalho, em procedimento estatístico semelhante ao aqui adotado, foi avaliado o efeito da sacarose, nitrato de amônio, NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , MnCl_2 , extrato de levedura como componentes de meios de cultura para o crescimento de *B. amyloliquefaciens*, usando o método de Plackett-Burman (Ferramenta utilizada para identificar os fatores mais importantes no início da fase de experimentação) na produção de lipopeptídeos. Os valores ótimos das variáveis testadas foram $21,17 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose, $2,50 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrato de amônio e $11,56 \text{ g.L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 , com produção de $134,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de lipopeptídeos (LIU et al., 2012). Como vimos, nas linhagens endofíticas utilizadas neste trabalho de *B. amyloliquefaciens*, cujo meio de cultura continha 20 g.L^{-1} de sacarose, 9 g.L^{-1} e peptona, $2,7 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura e igual concentração de malte, obtivemos resultados bem mais animadores nas condições padronizadas por planejamento fatorial: $1466,3 \text{ mg.L}^{-1}$ para *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b, $475,1 \text{ mg.L}^{-1}$ para *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a e $915,7 \text{ mg.L}^{-1}$ para *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b. Diante disto, verificamos que o uso da ferramenta estatística do planejamento fatorial neste trabalho foi determinante para otimizar parâmetros operacionais de cultivo a fim de reduzir custos na produção dos lipopeptídeos.

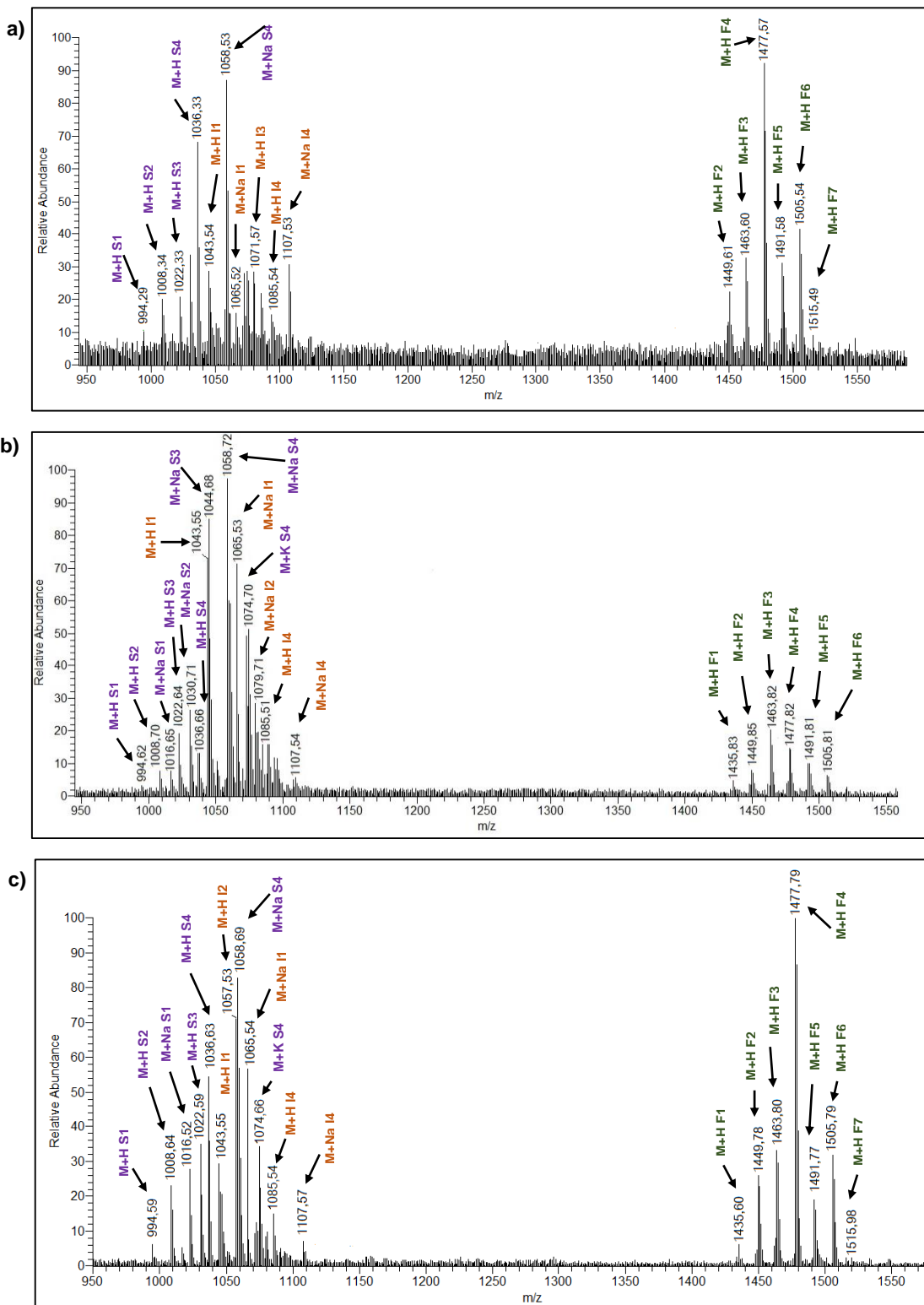
5.4. Análises do perfil químico dos extratos lipopeptídicos

As análises de inserção direta por ESI-MS dos extratos de *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50), *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164) e *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196), revelaram a presença de substâncias com íons de massa molecular na faixa de m/z 994-1085 e m/z 1435-1515 (Figura 32), característicos de lipopeptídeos das famílias de iturinas/surfactinas e fengicinas, respectivamente (BINIARZ & LUKASZEWIEZ, 2017;

YANG et al., 2015; RAAIJMAKERS et al., 2010). As diferenças de 14 ou/e 28 Da entre as espécies de íons moleculares observadas, revelaram três conjuntos de moléculas homólogas. O primeiro conjunto formado por sinais em m/z 994, 1008, 1022 e 1036 ($[M+H]^+$) e sinais correspondentes às moléculas sodiadas ($[M+Na]^+$) em m/z 1016, 1030, 1044 e 1058, respectivamente, é típico para os lipopeptídeos homólogos da surfactina (YANG et al., 2015). O segundo conjunto, com quatro sinais principais em m/z 1043, 1057, 1071 e 1085 ($[M+H]^+$), corresponde às moléculas protonadas dos lipopeptídeos da iturina (YANG et al., 2015; MALFANOVA et al., 2012; MORAN et al., 2010; PECCI et al., 2010; PEYPOUX et al., 1994). O terceiro conjunto, com sinais em m/z 1435, 1449, 1463, 1477, 1491, 1505 e 1505 ($[M + H]^+$), corresponde às moléculas protonadas dos lipopeptídeos homólogos da fengicina (BINIARZ & LUKASZEWIEZ, 2017).

5.5 Análises por espectrometria de massas das frações de PpC1 2.2b (LP164)

A análise por inserção direta das frações lipopeptídicas do extrato do sobrenadante livre de células de *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164), obtidas por SPE (item 4.7.2), indicou que a metodologia empregada foi eficaz na separação dos lipopeptídeos (Figuras 69A-A76A, no Apêndice) sugeridos como representantes das famílias das surfactina, iturina e fengicina (MALFANOVA et al., 2012; MORAN et al., 2010; PEYPOUX et al., 1994). Os sinais característicos da família da iturina foram observados em: m/z 1043 e 1057, nas frações obtidas com MeOH/H₂O 70% (E2), e em m/z 1071 e 1085 ($[M+H]^+$), nas eluídas com MeOH/H₂O 75% (E3) e 80% (E4). Os íons em m/z 1449, 1463, 1477, 1491 e 1505 ($[M+H]^+$), característicos das fengicinas, foram observados nos espectros das frações obtidas com MeOH/H₂O 85% (E5) e os sinais em m/z 994, 1008, 1022, 1036, 1050, 1064 e 1078 ($[M+H]^+$), típicos das surfactinas, nos espectros das frações obtidas com MeOH/H₂O 90% (E6) e 95% (E7). Nas frações eluídas com MeOH/H₂O 50% (E1) e 100% (E8) não foram observados sinais de m/z para lipopeptídeos.



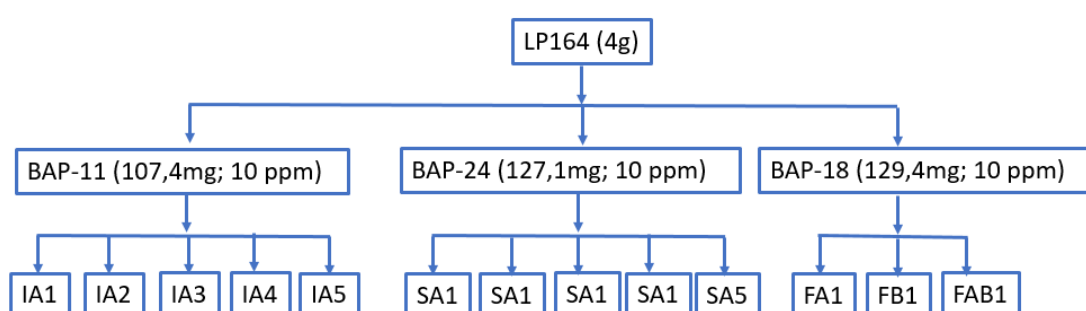
S=surfactina; I=Iturina; F=Fengicina

Figura 32. Espectro de íons totais dos extratos lipopeptídicos das bactérias endofíticas: (a) *B. amyloliquefaciens* GhcC1 2.1a (LP50), (b) *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164) e (c) *B. amyloliquefaciens* DgcR2 1.1b (LP196).

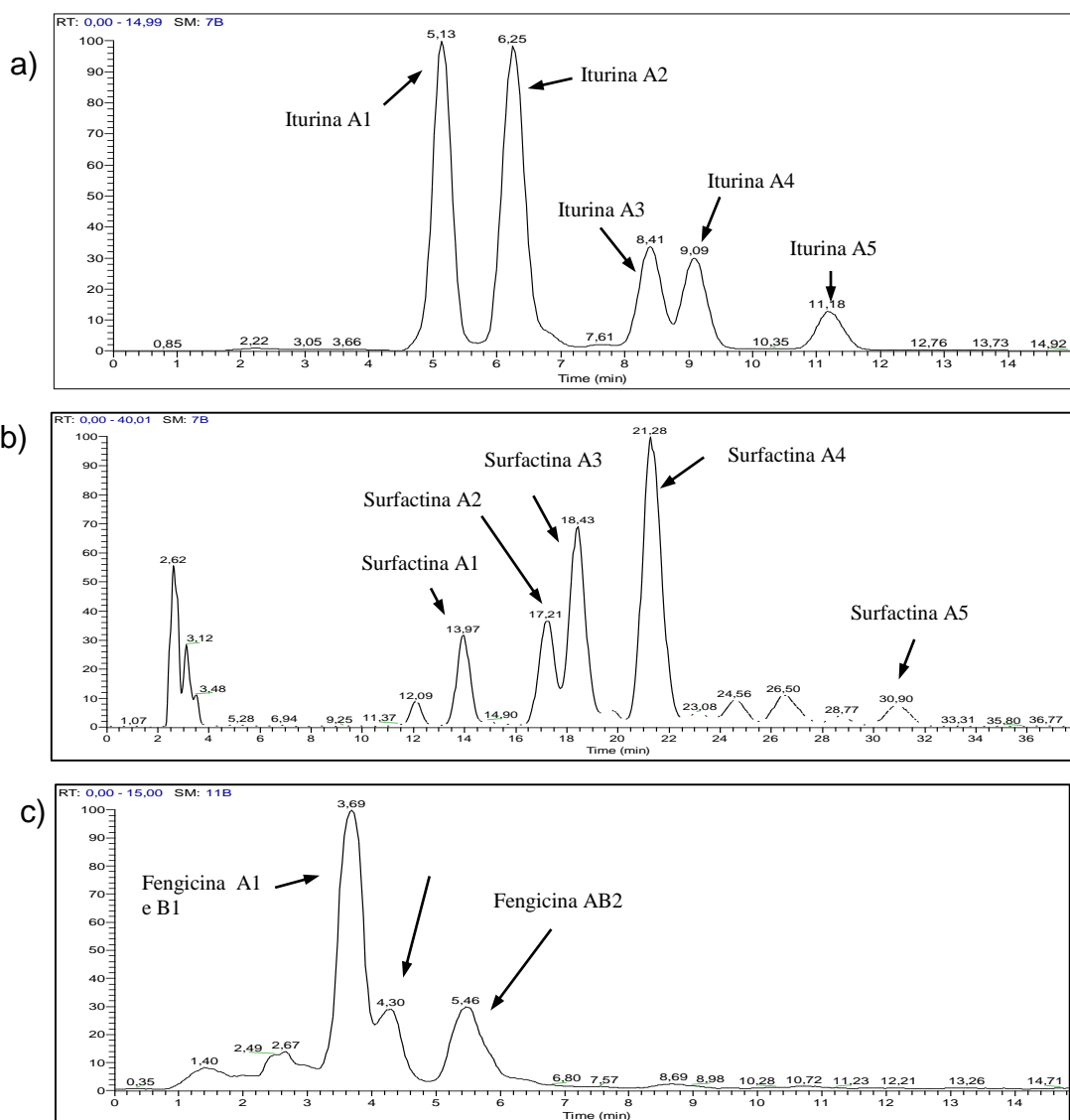
5.6 Análises por LC-MS das frações de PpC1 2.2b (LP164)

A análise por LC-MS das frações obtidas por SPE do extrato do sobrenadante livre de células de *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164) (Item 4.7.2) confirmou a presença de compostos com íons de massa molecular na faixa de m/z 1043-1085, m/z 994-1050 e m/z 1435-1505, característicos para iturinas, surfactinas e fengicinas, respectivamente (BINIARZ & LUKASZEWIEZ, 2017; YANG et al., 2015; RAAIJMAKERS et al., 2010). O cromatograma LC-APCI-MS para a fração BaP-11 mostrou 5 picos principais (Figura 33a), a (t_R) 5,13, 6,25, 8,41, 9,09 e 11,18 min, que exibiu íons cujo as massas monoisotópicas foram de m/z 1043, 1057, 1071, 1071 e 1085 ($[M+H]^+$) (Figura 34a). Estes íons são característicos de homólogos com diferença de 14 Da ($-CH_2-$) sendo similares aos valores de m/z para os lipopeptídeos da iturina (YANG et al., 2015; JACQUES, 2011).

A amostra BaP-24 mostrou 5 picos (Figura 33b) de (t_R) 13,97, 17,21, 18,43, 21,28, e 30,90 min, correspondente aos íons de m/z 1008, 1022, 1022, 1036 e 1050 ($[M+H]^+$) (Figura 34b). E para a amostra BaP-18 picos (Figura 33c) em (t_R) 3,69, 4,30 e 5,46 min, exibindo íons ($[M+H]^+$) de m/z 1463, 1491 e 1477, respectivamente (Figura 34c). Os grupos de íons detectados nas frações BaP-24 e BaP-18 com m/z entre 990-1100 e m/z entre 1400-1550, são similares a duas famílias de lipopeptídeos, surfactina e fengicina, respectivamente (BINIARZ & LUKASZEWIEZ, 2017; YANG et al., 2015; JACQUES, 2011).



Esquema 1: Fluxograma da identificação por LC-MS dos lipopeptídeos, iturina surfactina, e fengicina.

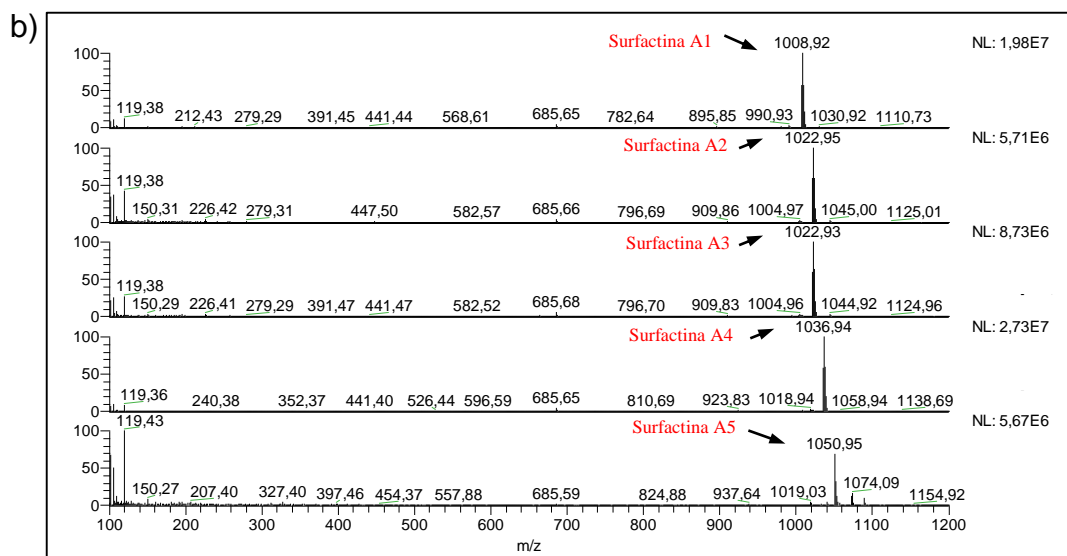
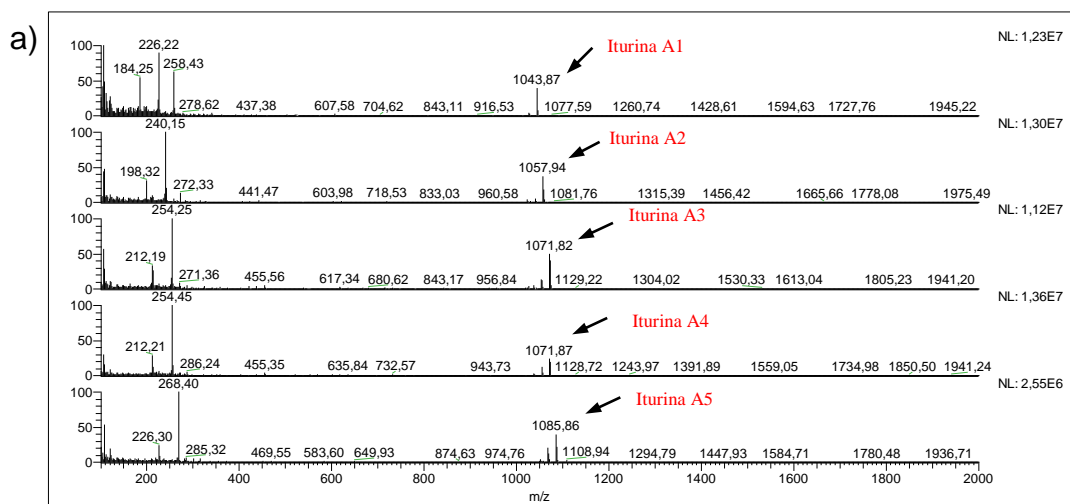


(a) Condição isocrática de eluição 70% de B em 25 minutos (0,635 mL/min). Fases móveis: água (A) e metanol (B). Coluna: Fenil-hexil (5 μ m, 150 x 4,60 mm). (b) Condição isocrática de eluição: 85% de B em 40 minutos (0,635 mL/min). Fases móveis: água (A) e metanol (B). Coluna: Fenil-hexil (5 μ m, 150 x 4,60 mm). (c) Condição isocrática de eluição: 75% de B em 25 minutos (0,635 mL/min). Fases móveis: solução ácida aquosa (0,2% ácido fórmico) (A) e metanol (B). Coluna: C18 (5 μ m, 150 x 4,60 mm).

Figura 33. Cromatogramas obtidos por HPLC em fase-reversa, modo TIC positivo. Frações do extrato LP164 de *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b: (a) BaP-11 (b) BaP-24 (c) BaP-18.

Além dos íons homólogos sugeridos para iturinas e fengicinas com diferenças de 14 Da, outros íons com a mesma massa molecular entre m/z , 1020-1072 (Figura 34) foram detectados a partir das análises por LC-APCI-MS, porém com tempos de retenção diferentes, sendo: m/z 1022 (tR 17,21) e m/z 1022 (tR 18,43), para a fração BaP-24 (Figura 33b) e 1071 (tR 8,41) e 1071 (tR 9,09) para BaP-11 (Figura 33a). É comum entre este grupo de substâncias a

presença de moléculas isóbaras, ocorrendo por modificações na ramificação terminal da cadeia lipídica, classificados como *normal*, *iso* e *anteiso*, (GOND et al., 2015; JACQUES, 2011; RAAIJMAKERS et al., 2010), porém não são possíveis serem distinguidos por espectrometria de massas.



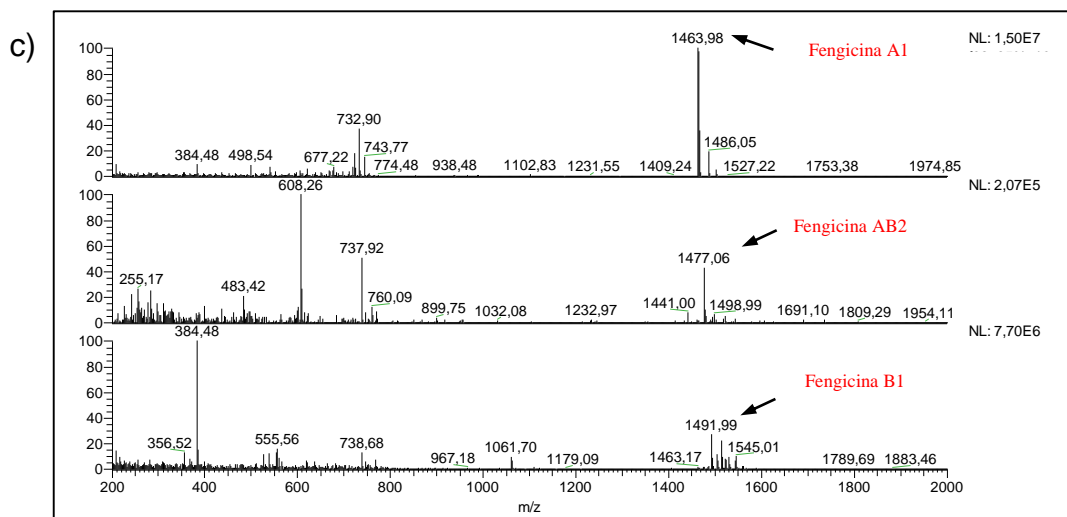


Figura 34. Espectros de LC-APCI-MS dos íons $[M+H]^+$ de: (a) iturinas (b) surfactinas e (C) fengicinas.

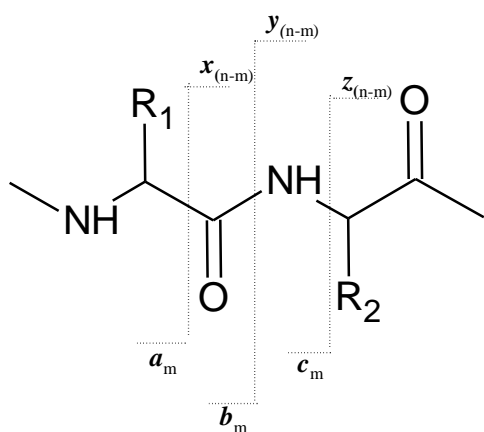
5.7 Determinação estrutural dos lipopeptídeos isolados de *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164)

A caracterização das estruturas dos lipopeptídeos homólogos sugeridos como membros das famílias da surfactina, iturina e fengicina foram elucidadas por análises de fragmentação por MS² em conjunto com as análises de RMN 1D e 2D, afim de obter informações mais precisas sobre sua estrutura química, uma vez que a espectrometria de massas não é suficiente para distinguir os seus isômeros e a heterogeneidade da cadeia lipídica, isto é, *normal*, *iso* e *anteiso*, o que é possível por análises de RMN.

A espectrometria de massa em tandem dos peptídeos cíclicos resulta na clivagem da ligação peptídica ou da ligação éster no esqueleto peptídico após a protonação (MU et al., 2019; BOYLE et al., 1991; HUE et al., 2001). Dependendo do local de clivagem que leva a abertura do anel pode-se observar diferentes tipos de séries de íons fragmentos.

A análise da sequência de aminoácidos por MS², foi realizada por meio do processo de dissociação induzida por colisão (*collision induced dissociation* – CID). Neste processo, os lipopeptídeos foram ionizados por *electrospray* e fragmentados na câmara de colisão, ao serem acelerados e colidirem com 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 dos íon-fragmentos (MANN et al., 1989). Estes íons podem ocorrer por

retenção da carga residual no lado N-terminal (gerando fragmentos **a**, **b**, e **c**, dependendo da ligação que é fragmentada) ou no C-terminal (gerando os fragmentos **x**, **y** e **z**, dependendo da ligação que é fragmentada) (Esquema 1), segundo a nomenclatura proposta por Roepstorff–Fohlmann–Biemann (1984). Como pode ser observado nesse esquema, os pares de íons **a/x**, **b/y** e **c/z** serão sempre íons fragmentos opostos e complementares entre si, isto é, a quantidade total de aminoácidos da molécula é igual a soma dos de cada par. 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 2. Representação esquemática da estrutura química geral de um peptídeo apresentando a nomenclatura proposta por Roepstorff-Fohlmann-Biemann dos fragmentos formados.

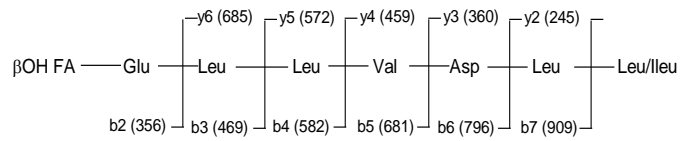
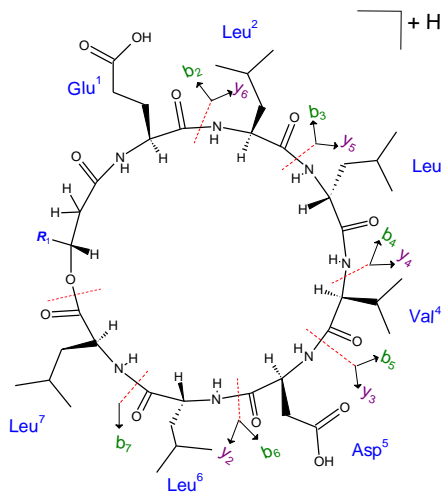
A fragmentação de peptídeos cíclicos como os lipopeptídeos, não ocorrem de forma usual, ou seja, de forma sequencial como ocorre nos peptídeos com cadeia linear. Nos compostos cíclicos da família da surfactina, por exemplo, existe uma ligação de lactona do aminoácido C-terminal com o ácido graxo β -hidróxi (β OH FA). A ligação éster dessa lactona é mais fraca do que a de uma amida, o suficiente para que a abertura do anel ocorra nela, iniciando as duas séries de íons, C-terminal e N-terminal.

5.7.1 Determinação estrutural das surfactinas por LC-ESI-MS/MS

Amostra Surfactina A2

A amostra Surfactina A2 do extrato de *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164) (Item 4.7.8) apresentou-se como um pó branco amorfo, correspondente a uma substância pura de massa molecular 1021,67531 e fórmula molecular $C_{52}H_{92}N_7O_{13}$, de acordo com as análises por LC-ESI-MS/MS de alta resolução, em que apresentou o íon em m/z 1022,6755 ($[M+H]^+$). No espectro de fragmentação deste íon precursor foram observadas duas séries de íons, *b* e *y*, formados através da clivagem da ligação éster protonada seguida pela sequência de clivagens das ligações peptídicas, além de íons de fragmentação interna e íons com perda de H_2O .

A primeira série (alifática) corresponde aos íons N-terminal do tipo *b* que correspondem às perdas de resíduos dos aminoácidos Leu/Ile⁷-Leu⁶-Asp⁵-Val⁴-Leu³-Leu/Ile², com m/z 909 (*b7*), m/z 796 (*b6*), m/z 681 (*b5*), m/z 582 (*b4*), m/z 469 (*b3*), e m/z 356 (*b2*). A segunda série (peptídica) corresponde aos íons fragmentos C-terminal do tipo *y* de m/z 685 (*y6*), m/z 572 (*y5*), m/z 459 (*y4*), m/z 360 (*y3*) e m/z 245 (*y2*) em que a fragmentação *y6* é coerente com a perda da cadeia ácido graxo da surfactina, ou seja: (C₁₄) β -OH-Glu¹-Leu/Ile²-Leu/Ileu³-Val⁴-Asp⁵-Leu/Ileu⁶. Fragmentações adicionais também confirmam a sequência de aminoácidos sugerida, pelos íons de m/z 1004 ($[M+H-H_2O]$), 441 ($[Leu+Asp+Val+Leu+H]^+$) e 227 ($[Leu+Leu/Ile+H]^+$), confirmando Leu/Ile na posição 7. De acordo com estes fragmentos, típicos de CID, a sequência observada é coerente com o íon de uma das isoformas da surfactina A ou C (C₁₄), após a abertura do anel na ligação éster (Figura 35). Para confirmar a sequência do lipopeptídeo, especialmente devido à alta proporção de leucina e / ou isoleucina na fração peptídica bem como a heterogeneidade da cadeia ácido graxo (*normal*, *iso* e *anteiso*) e isômeros foram realizadas análises de RMN de ¹³C e de ¹H, 1D e 2D.



m/z 1022,655 ($[M+H]^+$) - uma isoforma
Surfactina A (C_{14})

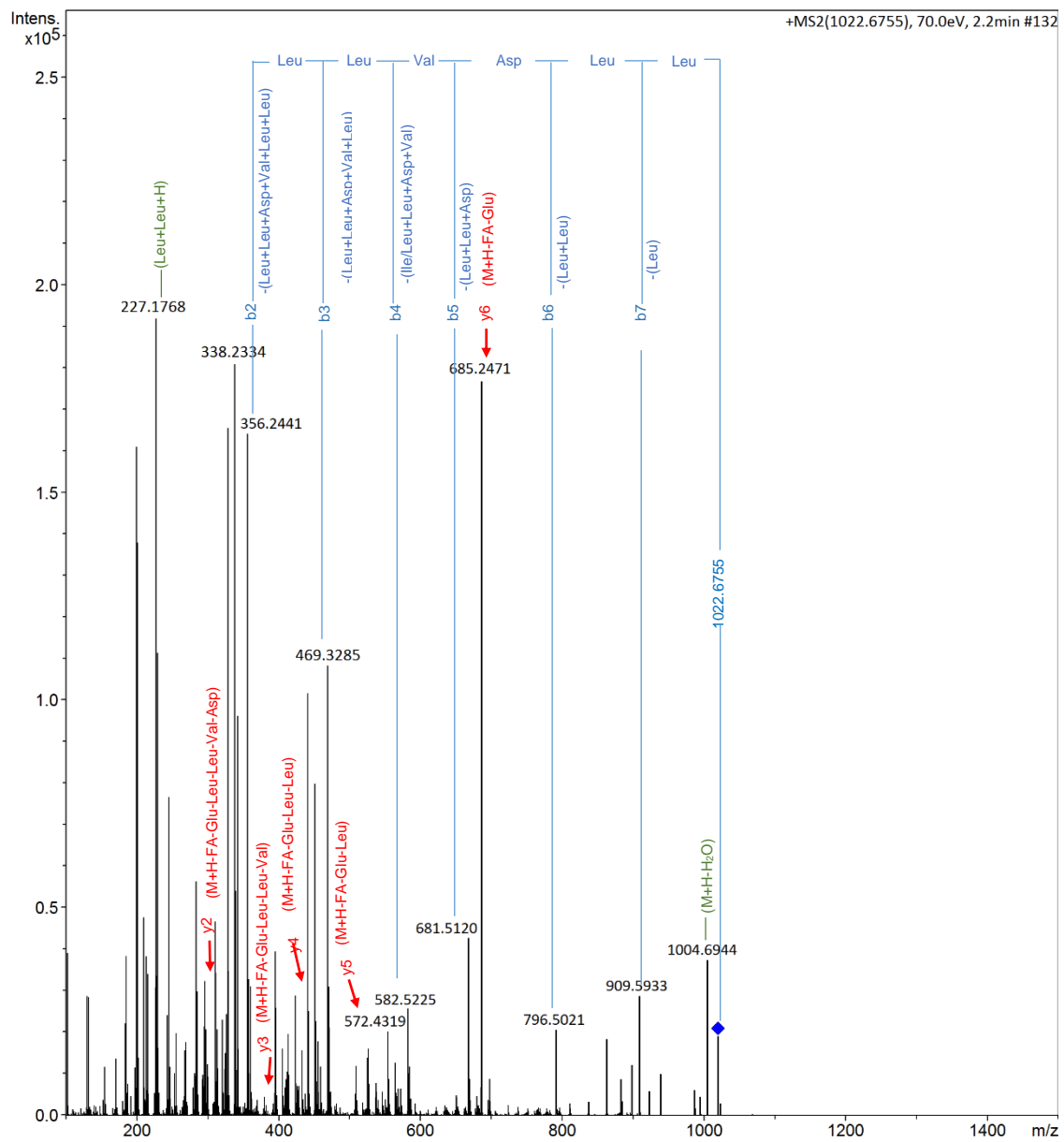


Figura 35. Espectro obtido por LC-ESI-MS/MS e proposta de fragmentação da amostra Surfactina A2 de *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164).

5.7.2 Determinação estrutural da amostra Surfactina A2 por RMN

Uma vez determinada a presença em Surfactina A2 de uma das isoformas das surfactinas A ou C (C₁₄) pelos dados de espectrometria de massas, os espectros de RMN 1D e 2D da amostra foram obtidos com a finalidade de ratificar esta presença e determinar de qual ou quais das isoformas se trata. No espectro de RMN de ¹H em DMSO-*d*₆ a 500 MHz (Figura 36) foram registrados sinais que confirmam a presença de cadeia longa alifática (CH₂ em δ 1,53-1,22) e sinais que confirmam o esqueleto peptídico, a saber: quatro sinais de hidrogênios α-metínicos comuns em ligações peptídicas (integrados para sete H-C, em δ 4,55-4,01), as quais foram confirmadas por cinco sinais com deslocamentos típicos de hidrogênios ligados a N (integrados para sete H-N entre δ 8,43-7,60). A ligação da cadeia lipídica com a parte peptídica foi observada pelo sinal em δ 5,05 de hidrogênio ligado a C-3 do β-hidroxi ácido formando ligação éster com um resíduo de aminoácido, típico desta família de lipopeptídeos. Além disso, estão presentes sinais entre δ 1,0 e 2,7 (Figura 37) característicos dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH₂, β e γ) e entre δ 0,7 e 1,0 os sinais correspondentes aos hidrogênios metílicos (CH₃).

No espectro de RMN de ¹³C de Surfactina A2 (Figura 38), também coerente com uma das isoformas das surfactinas A ou C (C₁₄) (ROMANO et al., 2010; ROMANO et al., 2013; TANG et al., 2007), foram observados sinais dos grupos metilênicos da cadeia lipídica em δ 29,4-29,0, dos dez grupos carbonila, em δ 174,4-170,6, sete grupos metínicos α-carbônicos peptídicos em δ 59,0-50,1, além dos outros sinais de carbonos metínicos e metilênicos em δ 42,0-22,5, e metílicos, em δ 23,4-14,4. O espectro de ¹³C, juntamente com o DEPT-135 (Figura 39), como era esperado, apresentaram 11 sinais de carbonos metílicos, 17 de metilênicos, 3 de metínicos (correspondentes a 5 grupos CH) e 8 de carbonos carbonílicos (correspondentes a 10 grupos C=O).

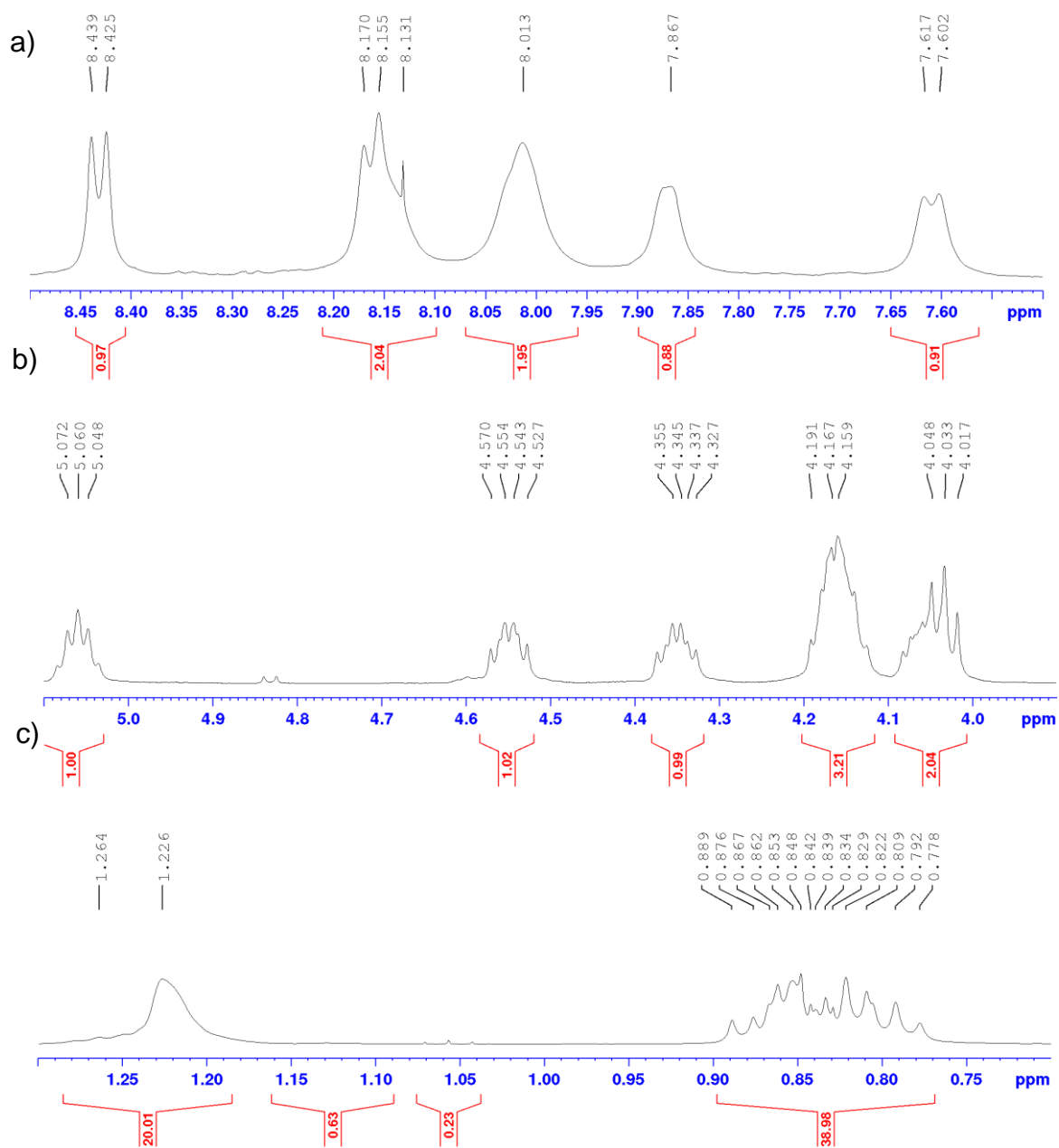


Figura 36. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Surfactina A2 em DMSO – d_6 (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos, c) hidrogênios metilênicos e metílicos.

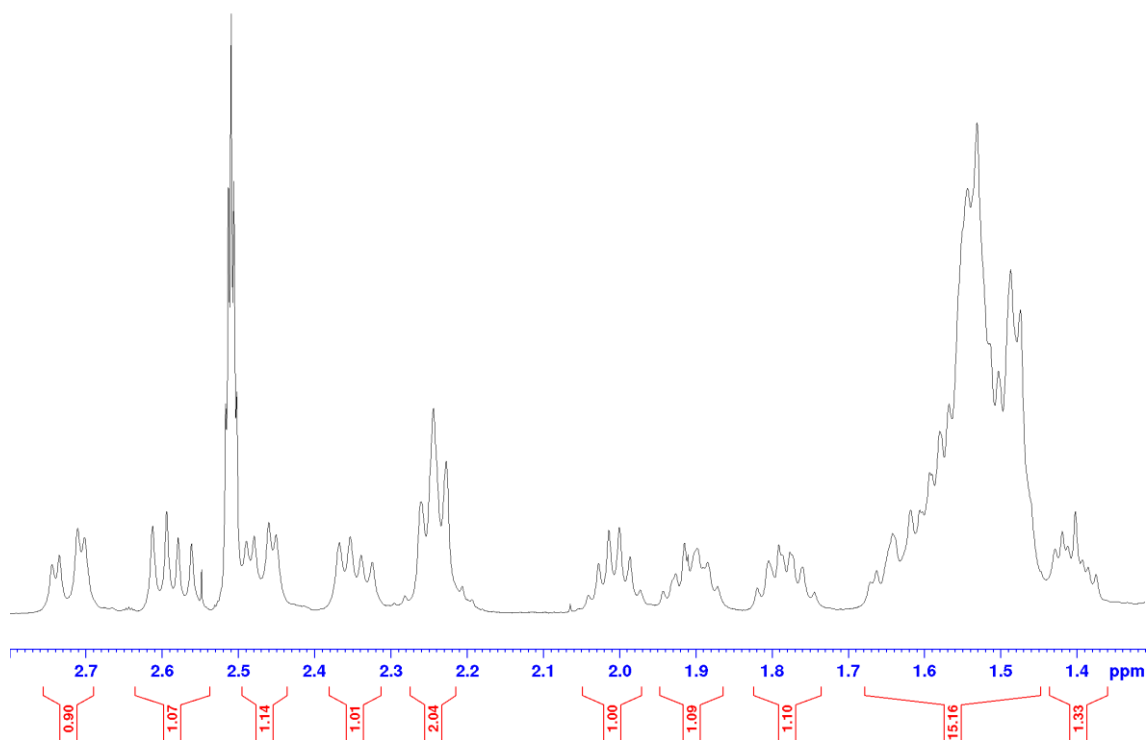


Figura 37. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Surfactina A2 em DMSO – d_6 (500 MHz): região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH_2 , β e γ).

No espectro de RMN de ^{13}C de Surfactina A2 não foram observados os sinais característicos da isoleucina em δ 10,9 e 15,4, respectivamente do $\text{C}\delta$ e do $\text{CH}_{3\gamma}$ (TANG et al., 2007), restando, portanto como possibilidades para o composto apenas as três isoformas das surfactinas A (C_{14}).

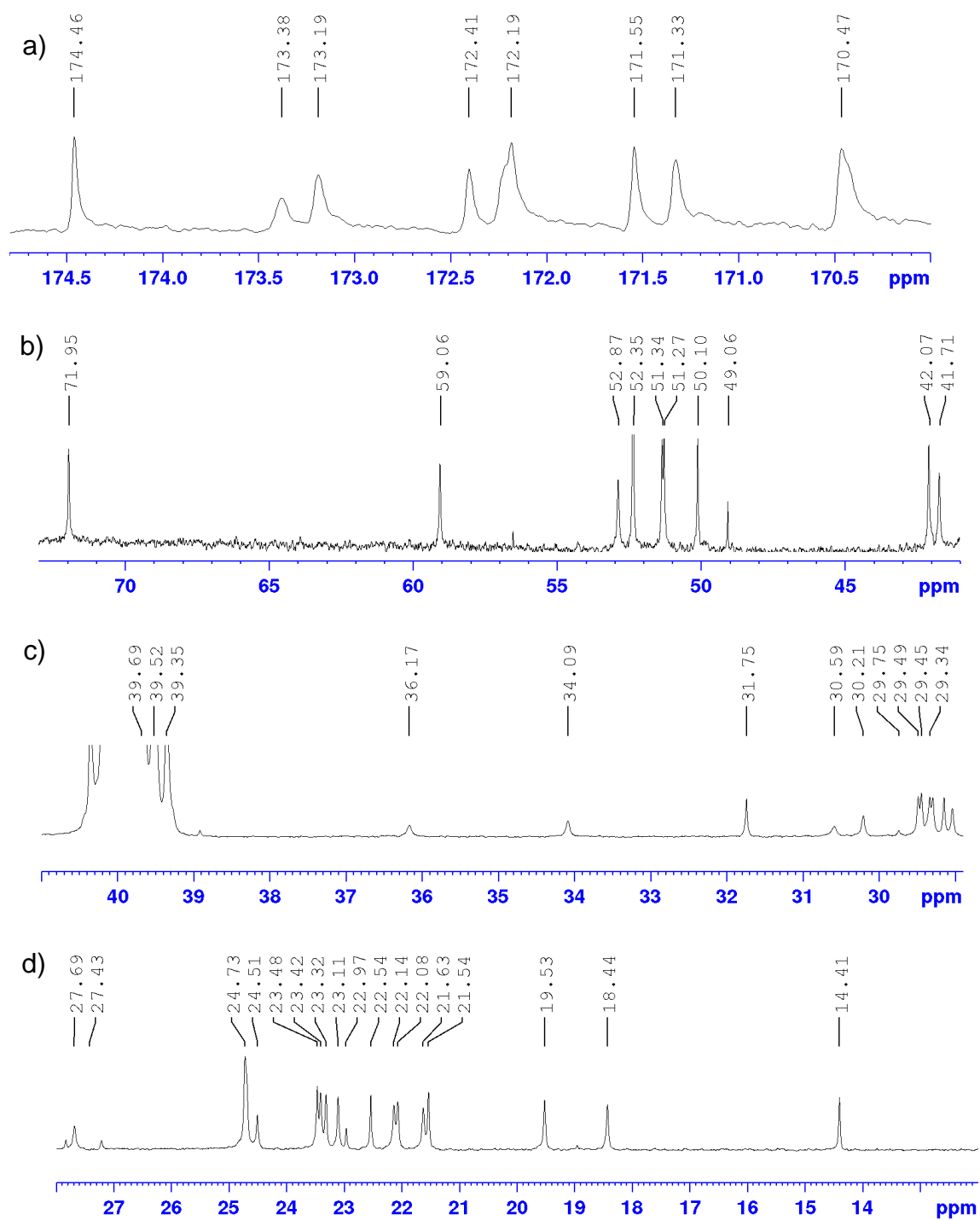


Figura 38. Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C da amostra Surfactina A2 em DMSO – d_6 (125 MHz): a) região dos carbonos carbonílicos, b) carbonos α -metínicos e β -metilênicos, c) cabonos metilênicos d) carbonos metilênicos e metílicos.

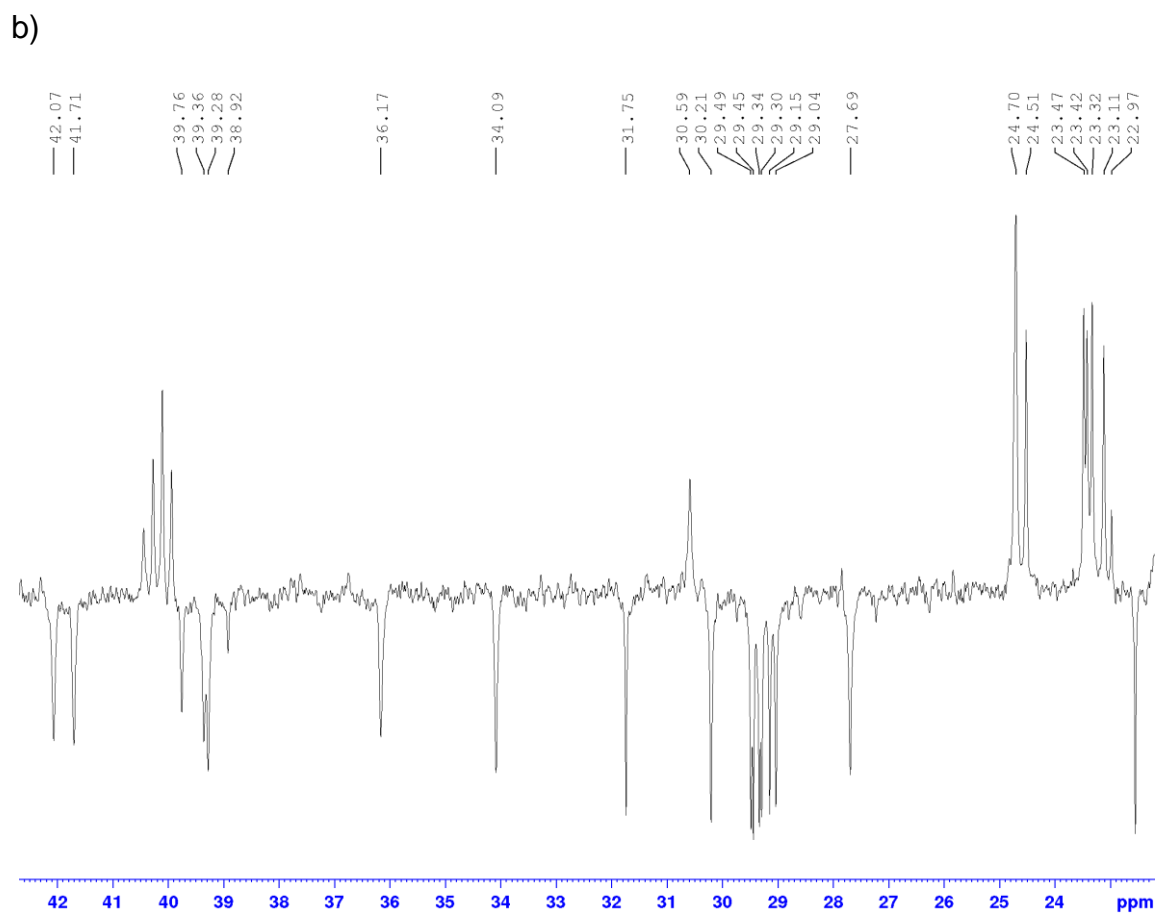
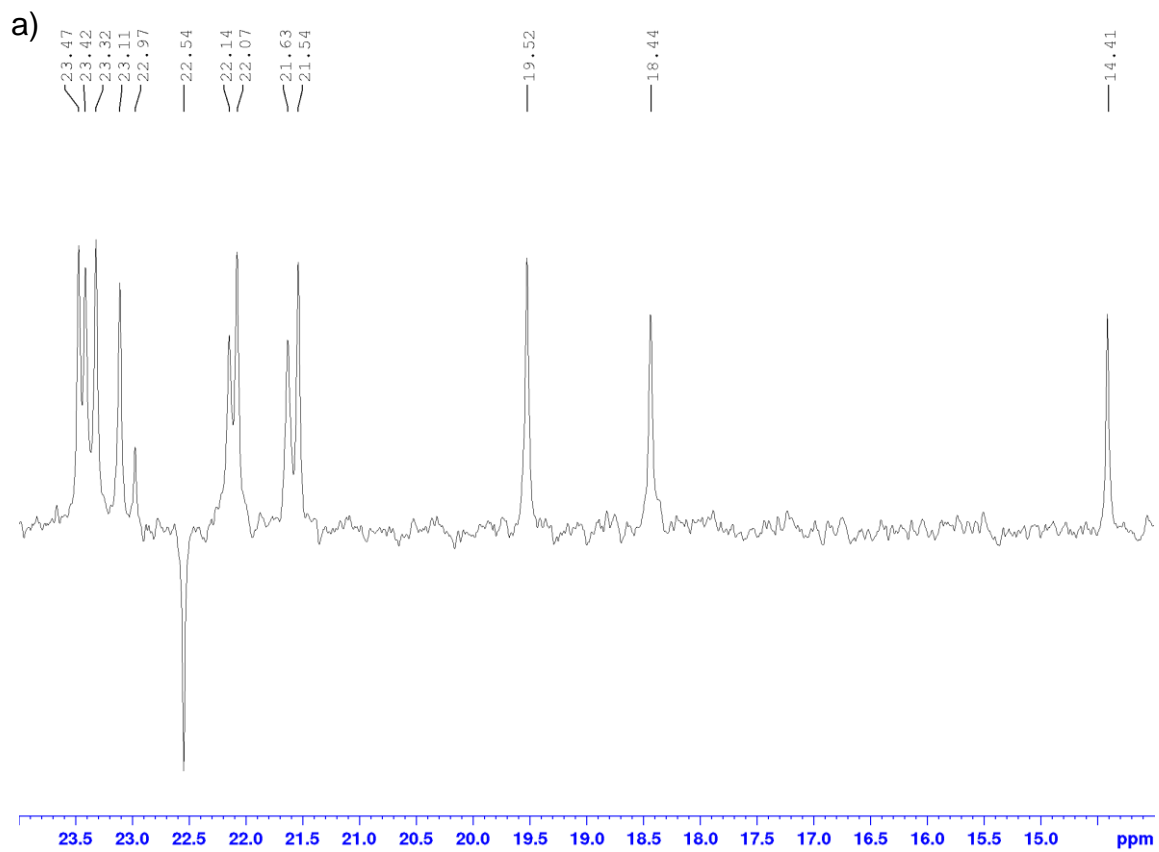


Figura 39. Ampliações do DEPT-135 em DMSO- d_6 (125 MHz) de Surfactina A2 nas regiões: (a) Carbonos metílicos (b) Carbonos metínicos e metilênicos.

A primeira etapa para a identificação da amostra Surfactina A2 envolveu a análise dos mapas de correlação de COSY, TOCSY e ROESY (Figuras 40-42). Estes dois últimos apresentam correlações mais precisas, onde através do TOCSY é possível obter correlações de acoplamentos de todos os prótons presentes em cada aminoácido individual, e o ROESY permite correlações para pares de prótons de aminoácidos que estão próximos um do outro, podendo assim estabelecer à sua posição na sequência peptídica.

O COSY (Figura 40) mostrou as correlações **HN-HC α** para os sete grupos de aminoácidos do lipopeptídeo em questão (Tabela 22). No mapa de correlação TOCSY (Figura 41), foram observadas as correlações que caracterizam esses sete resíduos de aminoácidos, a saber: ácido glutâmico (Glu), ácido aspártico (Asp), valina (Val) e leucina (Leu) (4x). Também foram observadas correlações do sinal em δ 5,05 do **HC-O** do β -hidroxi ácido graxo com os sinais dele próprio em δ 2,45 e 2,33 (H-2',2''), 1,53 (H-4') e 1,22 (H5'), além de correlações fracas com os sinais em δ 7,86 (**HN**) e 4,164 (**HC α**) do ácido glutâmico (Tabela 22), revelando uma das conexões desse ácido com o anel peptídico.

Em seguida, as sequências dos resíduos dos aminoácidos e o fechamento do macrociclo foram atribuídos pelo experimento ROESY (Figuras 42) através de correlações espaciais dos resíduos sequencialmente adjacentes, das quais destacamos: a correlação do sinal em δ 5,05 do 3-CH (originalmente, estava ligado ao oxigênio do β -hidroxi ácido graxo) com δ 7,86 (**HN**) do Glu 1, do sinal deste mesmo aminoácido em δ 4,164 (**HC α**) com o sinal em δ 8,01 (**HN**) da Leu 2, do sinal em δ 4,15 (**HC α**) de Leu 2 com o sinal em δ 8,14 (**HN**) de Leu 3, do sinal deste mesmo aminoácido em 4,166 com o sinal em δ 8,02 (**HN**) de Val 4, do sinal em δ 4,03 (**HC α**) de Val 4 com o sinal em δ 8,16 (**HN**) de Asp 5, do sinal deste mesmo aminoácido em δ 4,55 com o sinal em δ 7,62 (**HN**) de Leu 6, do sinal em δ 4,35 (**HC α**) de Leu 6 com o sinal em δ 8,43 (**HN**) de Leu 7 e, completando o fechamento do macrociclo, as correlações do sinal em δ 4,05 (**HC α**) da Leu 7 com os sinais em δ 5,05 (**HC β**), 1,53 e 1,22 da cadeia do β -hidroxi ácido graxo (Tabela 22).

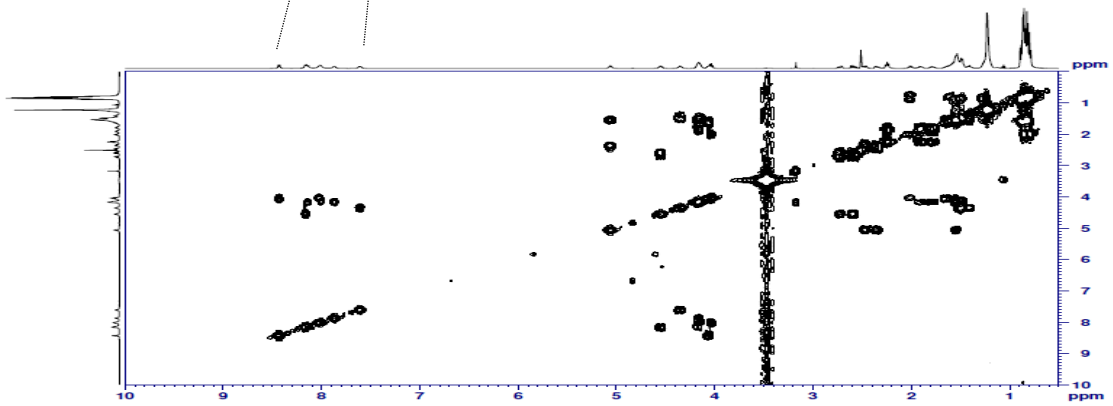
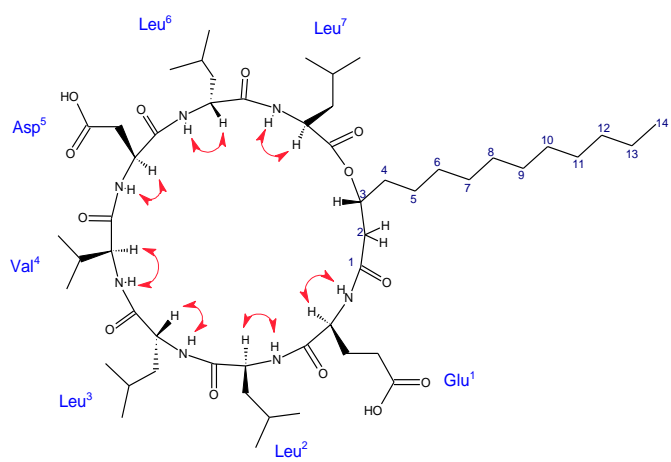
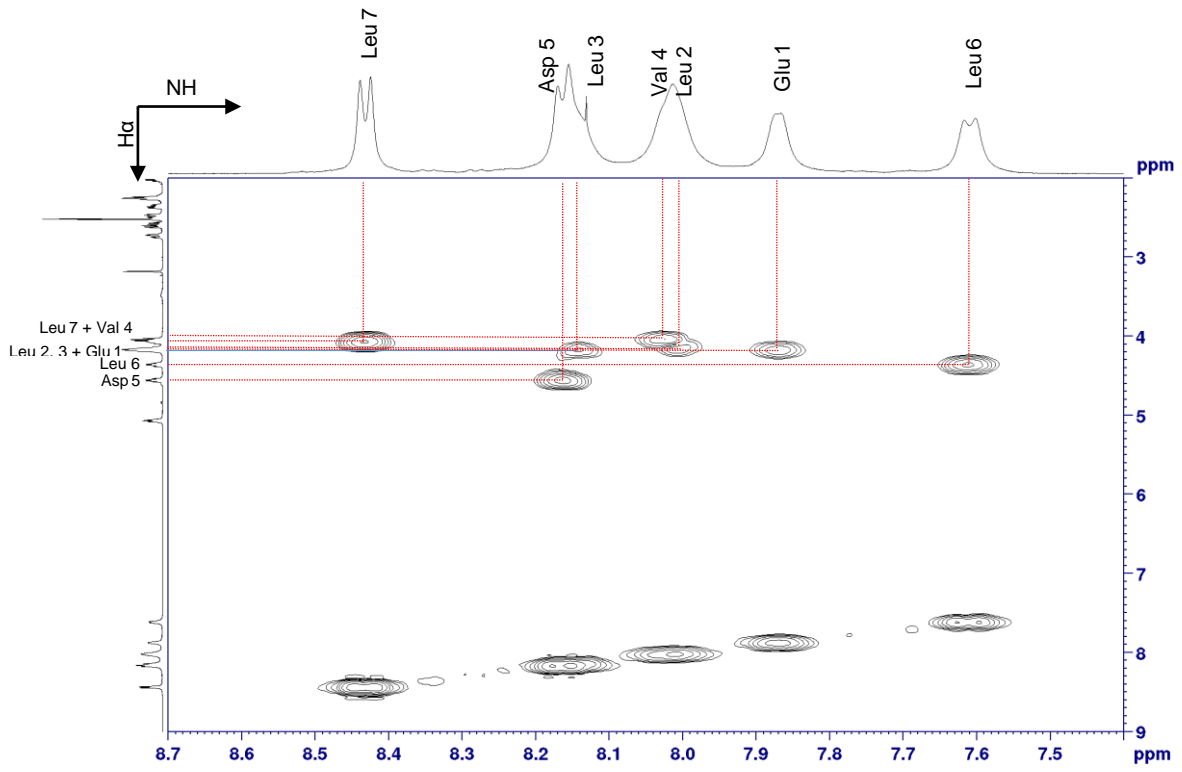


Figura 40. Correlações homonucleares $^1\text{H} - ^1\text{H}$ observadas no experimento de COSY para os hidrogênios NH-CH α da amostra Surfactina A2 em DMSO- d_6 (500 MHz).

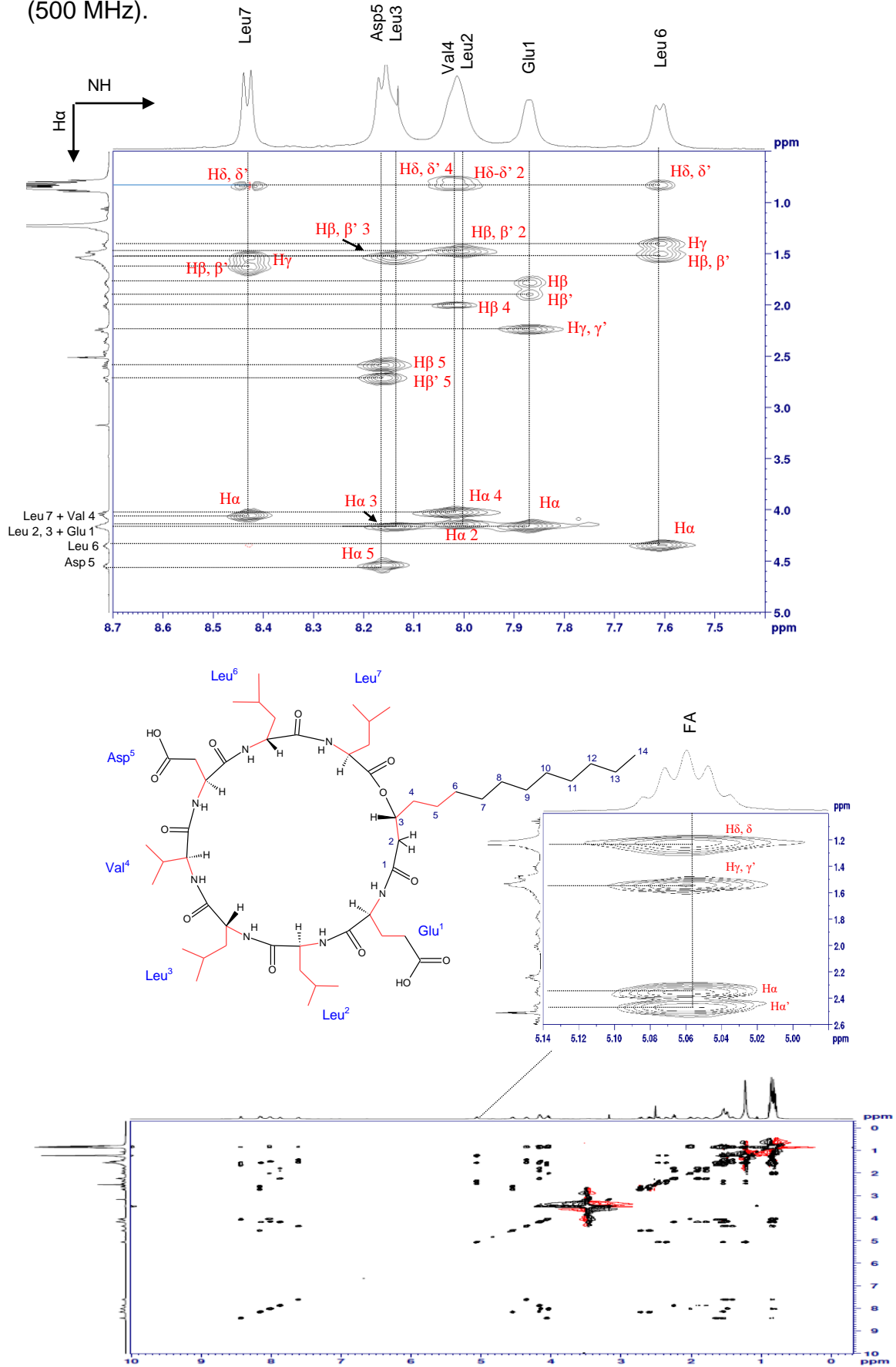


Figura 41. Mapa de correlação ^1H - ^1H TOCSY e ampliação da região de NH/H α , β , γ e δ da substância Surfactina A2 em DMSO- d_6 (500 MHz).

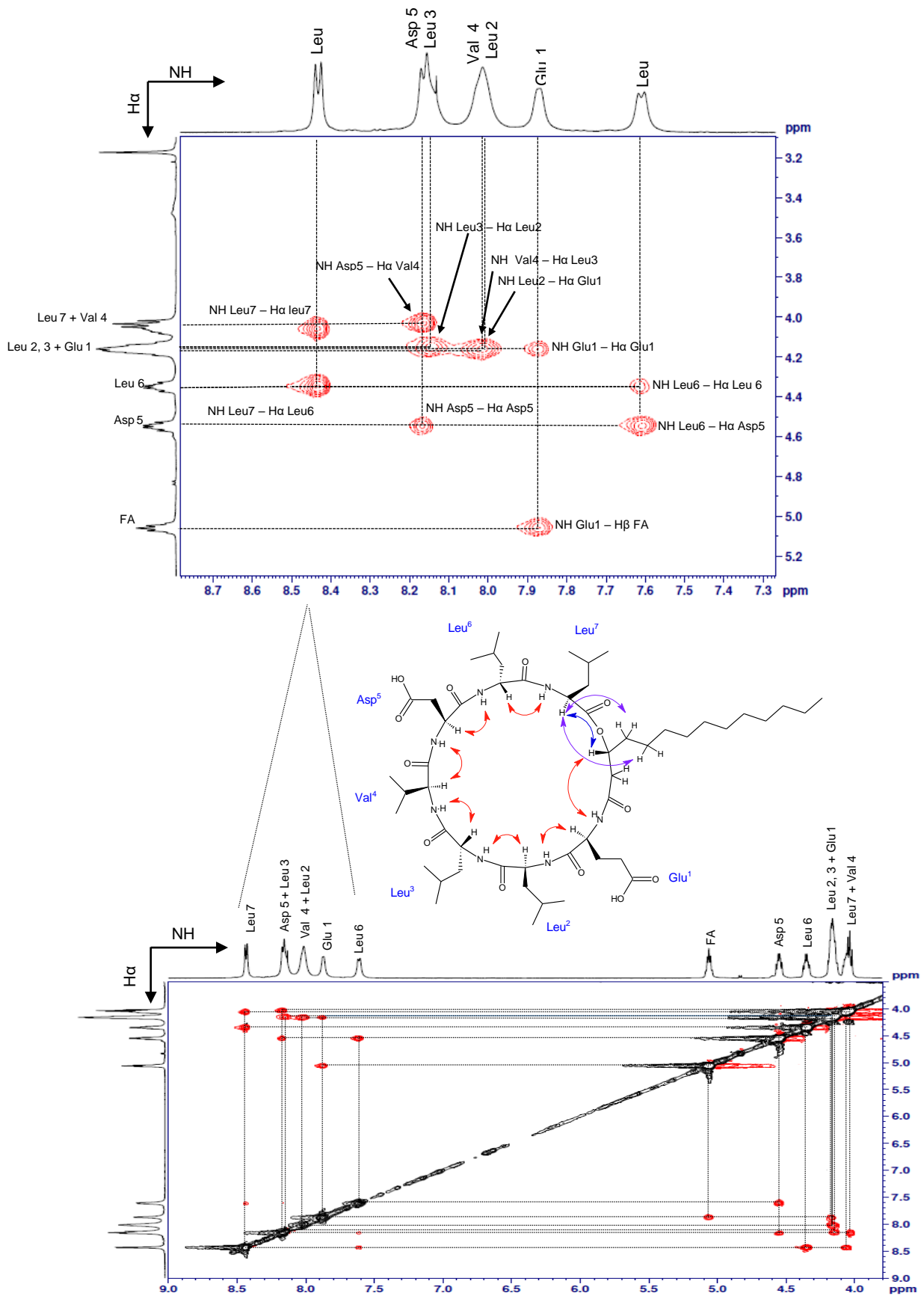


Figura 42. Mapa de correlação ROESY e ampliação da região NH/H α da substância Surfactina A2 em DMSO-*d*6 (500 MHz).

Uma vez que a atribuição dos hidrogênios (HN e H α) de cada resíduo foi realizada, o espectro ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC permitiram a atribuição dos carbonos protonados e quaternários correspondentes. A partir de correlações HSQC (Figura 43) foi possível confirmar a presença do metil carbinol (CHOH) pelo sinal em δ 71,9 ligado ao H-3 em δ 5,05 da cadeia β -hidroxi ácido graxo (Tabela 22). Também foi possível concluir a partir de correlações HMBC (Figura 44a) entre o sinal metino em δ 5.05 com o sinal em δ 172, 2 da “Lactona” de Leu 7 (gerada no processo de ciclização com o ácido graxo – hidroxila do carbono 3) que surfactina A2 é um depsipeptídeo monocíclico.

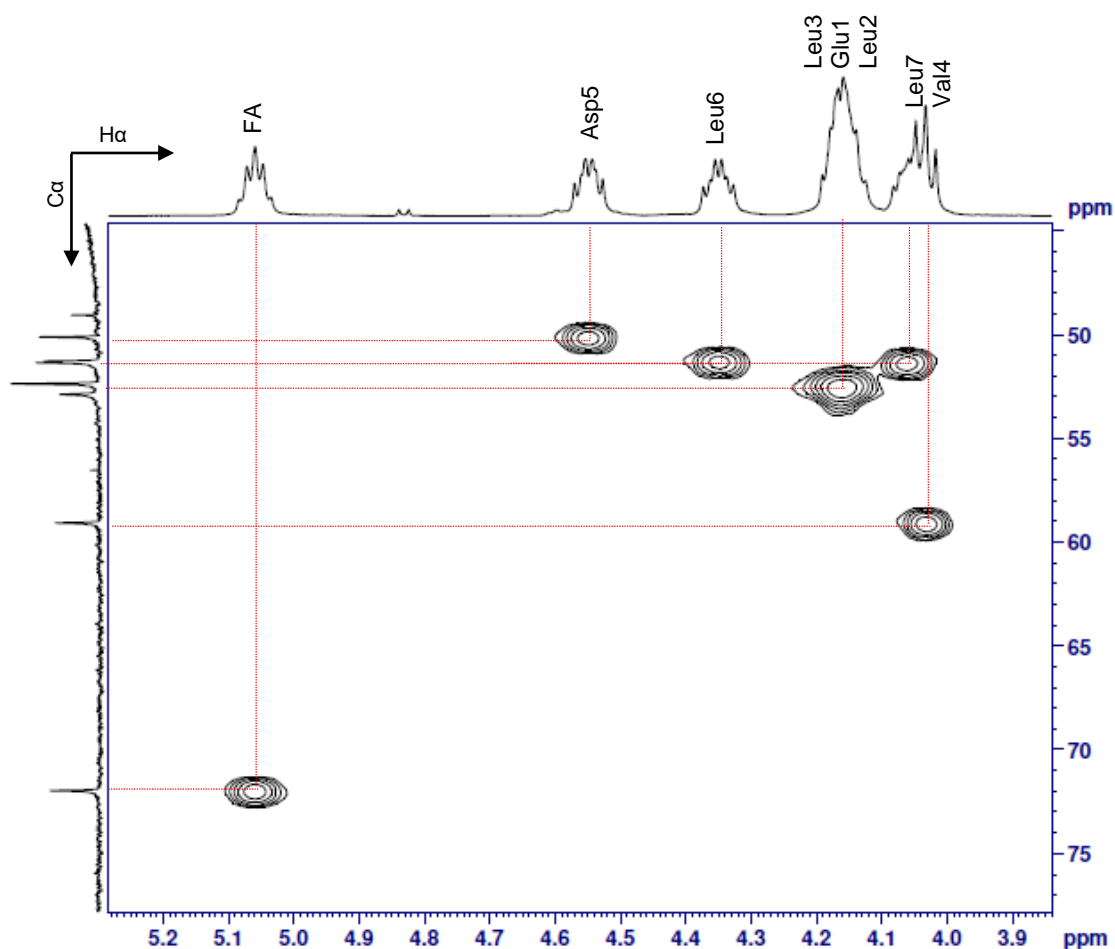


Figura 43. Ampliação H α /C α do mapa de correlação ^1H - ^{13}C de HSQC da amostra Surfactina A2 em DMSO-*d*6 (500 MHz).

Em seguida, a determinação da conformação (*normal*, *iso* ou *anteiso*) da cadeia β -hidroxi ácido graxo de Surfactina A2 foi realizado pelo experimento HMBC, e DEPT 135° comparados com a literatura (LIN et al., 1994). A partir do mapa de correlação HMBC (Figura 44b) foi possível observar o sinal em δ 0,85 (H-14) correlacionando com os sinais dos carbonos em δ 22,5 e δ 31,6 (C-13 e C-12, respectivamente) e o sinal em δ 1,22 (H-11) correlacionando com o carbono metilênico em δ 22,5 (C-13). Os dados de DEPT 135° (Figura 45) confirmaram os carbonos metilênicos δ 29,4, 31,6 e 22,5 (C11-C13, respectivamente) e o metil terminal em δ 14,4 (C-14). Todas as atribuições de Surfactina A2 são coerentes com a surfactina A (*normal*-C₁₄) (TANG et al. 2007; SINGH et al., 2020), porém este trabalho é o primeiro que são atribuídos todos os dados de correlação a maiores distâncias (TOCSY e ROESY). Estas correlações são fundamentais para a atribuição inequívoca das conexões. Todas as atribuições de ressonância 1D e 2D, bem como ¹³C para Surfactina A2 estão resumidas na Tabela 22.

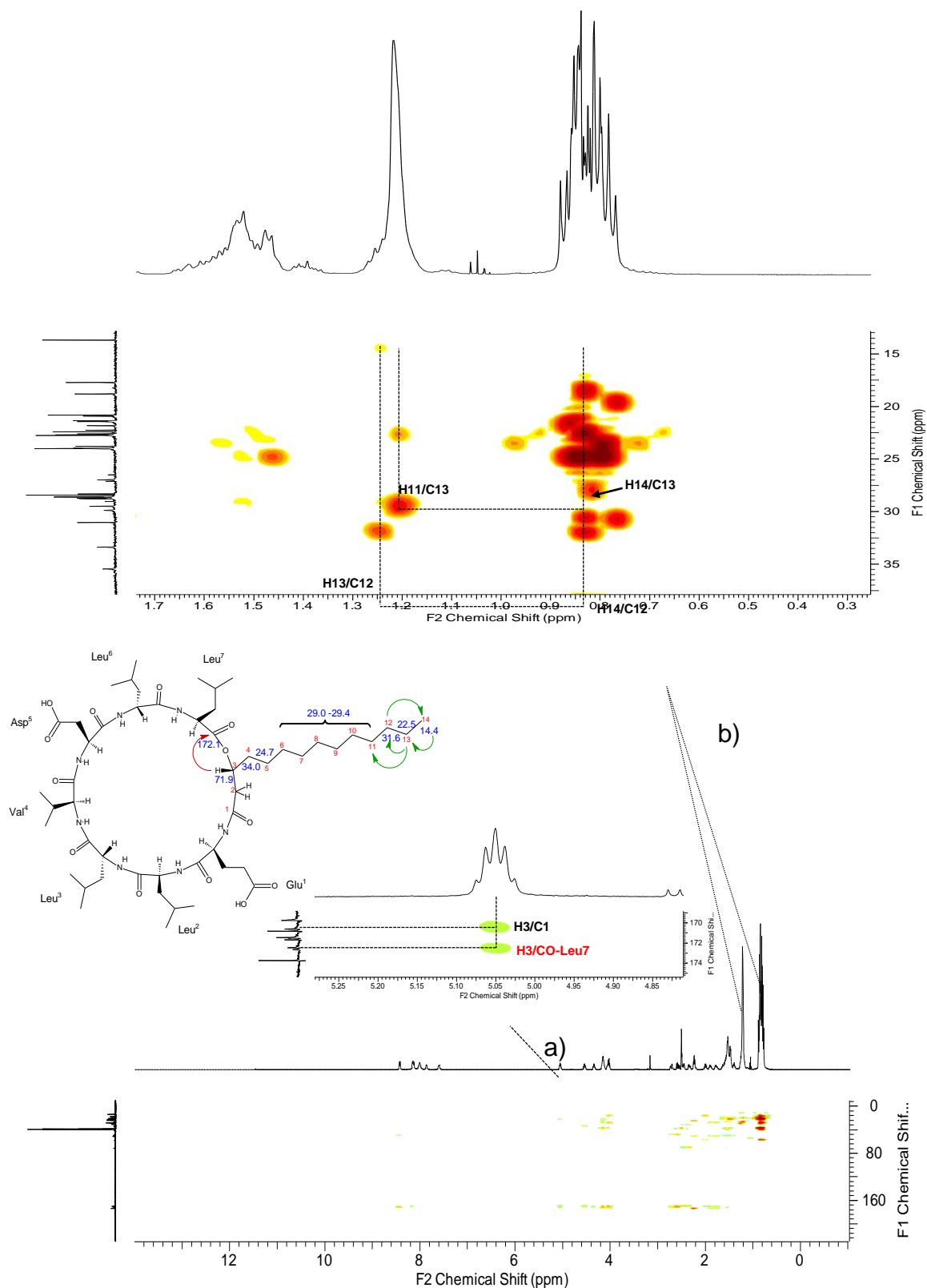


Figura 44. Correlações heteronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas no experimento de HMBP em $\text{DMSO}-d_6$ (500 MHz) para Surfactina A2. (a) sinal metino em δ 5.05 correlacionando com o sinal em δ 172,2 da “Lactona” de Leu 7 (b) correlações para os grupos terminais da cadeia oriunda do ácido graxo.

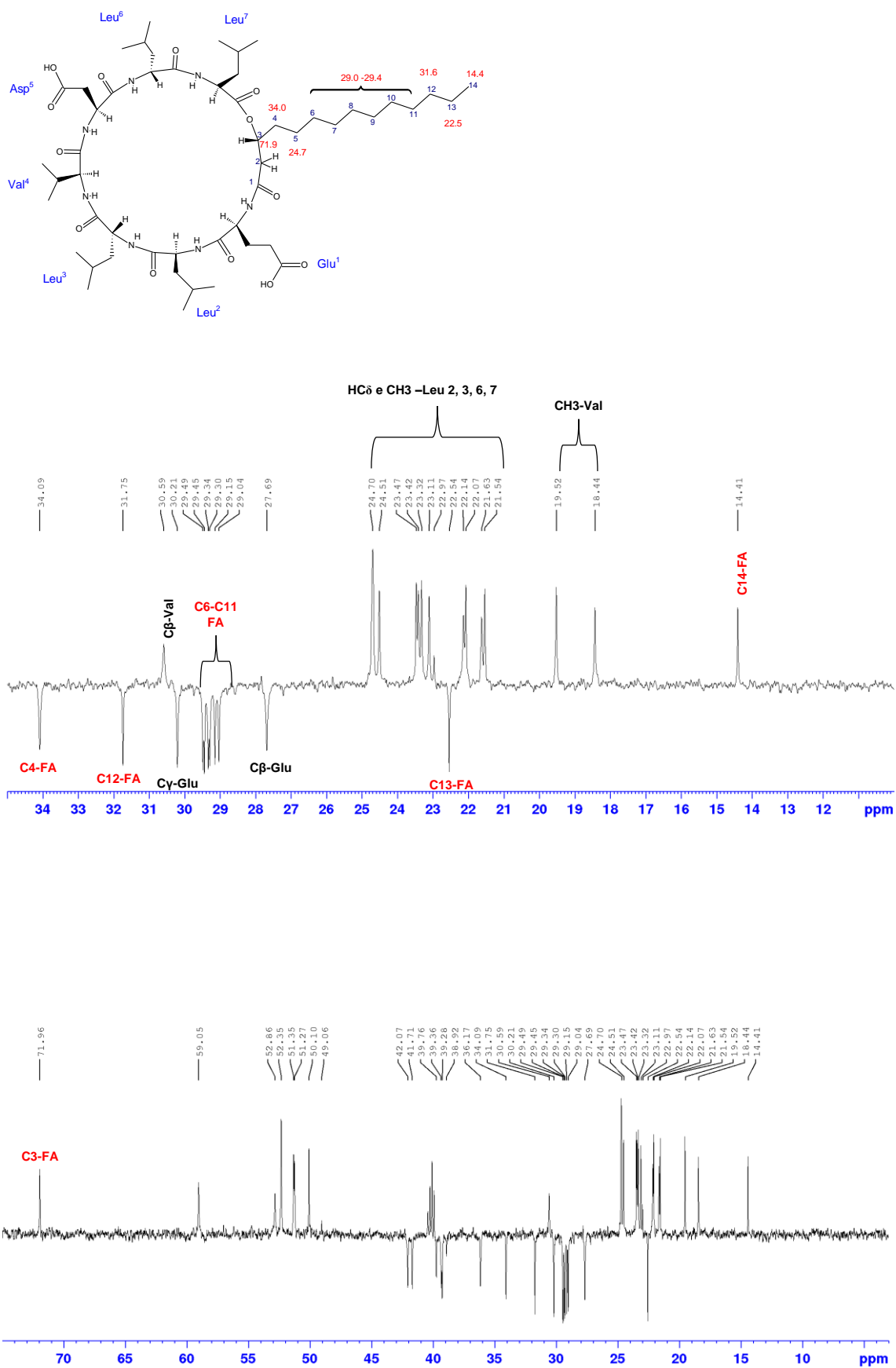


Figura 45. Espectro de DEPT 135° da substância Surfactina A2 em DMSO-d₆ (125 MHz).

Tabela 22. Dados de RMN 1D e 2D da amostra Surfactina A2 – Surfactina A (*normal-C*₁₄).

Amino ácido	Posição	¹ H δ (mult., J em Hz) ^a	¹ H δ (mult., J em Hz) ^b	¹³ C/HSQC ^a	¹³ C ^b	COSY ^a	HMBC ^a	TOCSY ^a	ROESY ^a
Glu-1	<i>α</i>	4,164 (m)	4,21 (m)	52,8	52,0	1,78; 7,86	27,8; 30,2; 171,5	1,78; 1,91; 2,24; 7,86	1,78; 1,91; 2,24; 7,86; 8,01
	<i>β</i>	1,78 (m)/	1,81 (m)/	27,8	26,9	2,24; 4,164	30,1; 52,8; 171,5; 174,4	1,91; 2,24; 4,164; 7,86	1,91; 2,24; 4,164; 7,86
		1,91 (m)	1,94 (m)						
	<i>γ</i>	2,24 (m)	2,31 (m)	30,2	29,5	1,78; 1,91	27,8; 52,8; 174,4	1,78; 1,91; 4,164; 7,86	0,84; 1,48; 1,78; 1,91; 4,164; 7,86
	<i>δ</i>	-	-	174,4	172,8	-	-	-	-
	NH	7,86 (s)	7,81 (d, 6,6)	-	-	4,164	-	1,78; 1,91; 2,24; 4,164	1,78; 1,91; 2,24; 2,35; 2,47; 5,05; 4,164
	CO	-	-	171,5	170,40	-	-	-	-
Leu-2	<i>α</i>	4,15 (m)	4,19 (m)	52,3	51,7	1,48; 8,01	24,7; 39,3; 173,1	0,84; 1,48; 8,01	0,84; 1,48; 1,50; 8,01; 8,14
	<i>β</i>	1,48 (m)	1,49 (m)	39,3	39,4	0,84; 4,15	24,7; 39,3	0,84; 4,15; 8,01	0,84; 4,15; 8,01
	<i>γ</i>	1,50 (m)	1,49 (m)	24,7	24,3	0,84; 4,15	24,7; 39,3	0,84	0,84; 1,48
	<i>δ</i> _I	0,84 (m)	0,85 (m)	21,5	23,0	-	39,3	1,48; 8,01	1,48

	δ_2	0,84 (m)	0,85 (m)	21,6	22,9	-	39,3	1,48; 8,01	1,48
	NH	8,01 (s)	7,99 (d, 5,7)	-	-	4,15	-	0,84; 1,48; 4,15	0,84; 1,48; 4,164; 8,01
	CO	-	-	173,1	172,1	-	-	-	-
Leu-3	α	4,166 (m)	4,19 (m)	52,3	51,8	1,53; 8,14	39,6; 173,3	0,85; 1,53; 8,14	0,85; 1,53; 1,58; 8,02
	β	1,53 (m)	1,54 (m)	39,7	39,4	4,166;	24,7; 52,3	0,85; 4,166	0,85; 4,166
	γ	1,58 (m)	1,54 (m)	24,7	24,2	-	39,7	0,85	0,85
	δ_1	0,85 (m)	0,80 (m)	22,1	22,5	-	24,7	1,53	1,53; 1,58
	δ_2	0,85 (m)	0,87 (m)	22,0	22,4	-	24,7	1,53	1,53; 1,58
	NH	8,14 (d, 7,1)	8,29 (d, 7,1)	-	-	4,166	-	0,85; 1,53; 4,166	1,53; 4,15
	CO	-	-	173,3	172,2	-	-	-	-
Val-4	α	4,03 (m)	4,09 (t, 8,3)	59,0	58,1	2,01; 8,02	18,4; 19,5; 30,5; 171,3; 173,3	0,78; 0,85; 2,01; 8,02	0,79; 0,85; 2,01; 8,166
	β	2,01 (m)	1,96 (m)	30,6	30,5	0,78	-	0,78; 0,85; 4,03; 8,02	0,78; 0,85; 4,03
	γ_1	0,78 (m)	0,75 (m)	18,4	17,9	0,85	59,0	2,01	0,85; 2,01; 4,03
	γ_2	0,85 (m)	0,85 (m)	19,5	19,0	-	18,6; 30,6; 59,0	2,01	0,78; 2,01
	NH	8,02 (s)	7,74 (d, 8,3)	-	-	4,03	-	0,78; 0,85; 2,01; 4,03	0,78; 0,85; 2,01; 4,03; 4,166
	CO	-	-	171,3	170,5	-	-	-	-

Asp-5	α	4,55 (m)	4,54 (m)	50,1	49,6	2,73; 2,59; 8,16	36,1; 170,45; 172,4	2,59; 2,73; 8,16	2,59; 2,73; 7,62; 8,16
	β	2,73 (dd, 4,8, 12,0) /	2,71 (dd, 5,1, 16,6)/	36,1	35,9	4,55	50,1	2,59; 4,55; 8,16 2,73; 4,55; 8,16	0,85; 2,59; 4,55; 8,16
		2,59 (m)	2,60 (dd, 8,8,16,6)			4,55	50,1		0,85; 1,49; 2,73; 4,55; 8,16
	γ	-	-	172,4	169,9	-	-	-	-
	NH	8,16 (m)	8,15 (d, 7.4)	-	-	4,55	4,03; 171,3	2,59; 2,73; 4,55	0,85; 2,73; 2,59; 4,03; 4,55
	CO	-	-	170,45	171,6	-	-	-	-
	Leu-6	α	4,35 (m)	4,51 (m)	51,3	50,9	1,49; 7,62	42,0; 172,1	0,83; 1,40; 1,49; 7,62
	β	1,49 (m) 1,40 (m)	1,44 (m)	42,0	41,5	4,35 4,35	22,9 23,1; 51,3	0,82; 7,62 0,83; 4,35; 7,62	1,40; 2,59; 4,35 0,83; 4,35
	γ	1,55 (m)	1,44 (m)	24,7	24,1	-	42,0	0,83	0,82
	δ_1	0,82 (m)	0,84 (m)	22,9	22,0	-	24,7; 42,0	1,40; 4,35; 7,62	1,40; 1,49; 4,35
	δ_2	0,83 (m)	0,84 (m)	23,1	21,8	-	42,0	1,40; 4,35; 8,43	4,35
	NH	7,62 (d, 7,5)	7,62 (d, 8,5)	-	-	4,35	-	0,82; 0,83; 1,40; 1,49; 4,35	1,49; 4,35; 4,55; 8,16; 8,43
	CO	-	-	172,1	171,8	-	-	-	-
Leu-7	α	4,05 (m)	4,30 (m)	51,2	50,7	1,64; 8,43	39,5; 172,1	0,85; 1,64; 1,54; 8,43	0,85; 1,21; 1,50; 1,64; 8,43

Ácido graxo	β	1,64 (m)	1,53 (m)	39,5	38,9	1,54; 4,05	24,5; 51,2	0,85; 4,05; 8,43	1,54; 4,05; 8,43
	γ	1,54 (m)	1,37 (m)	24,5	24,0	-	39,5	0,85	0,85; 1,64
	δ_1	0,85 (m)	0,81 (m)	23,41	21,2	-	24,5	1,21; 1,53; 5,05	1,54; 1,53; 1,64; 4,05
	δ_2	0,85 (m)	0,81 (m)	23,47	21,1	-	24,5	1,21; 1,53; 5,05	1,54; 1,53; 1,64; 4,05
	NH	8,43 (d, 6,8)	8,59 (d, 6,6)	-	-	4,05	51,3; 172,1	0,85; 1,54; 1,64; 4,05	0,85; 1,64; 4,05; 4,35; 7,62
	CO	-	-	172,1	171,8	-	-	-	-
	1	-	-	170,6	169,9	-	-	-	-
	2	2,34 (dd,14,3, 7,0)/ 2,45 dd, 9,7, 4,9)	2,50 (m)/ 2,34 (m)	41,7	41,2	5,05 5,05	34,0; 71,9; 170,4/71,9; 170,4	1,22; 1,53; 2,45; 5,05 1,22; 1,53; 2,34; 5,05	1,22; 1,53; 2,45; 5,05; 7,86 1,22; 1,53; 2,34; 5,05; 7,86
	3	5,05 (m)	5,07 (m)	71,9	71,4	1,53; 2,34; 2,45	24,7; 34,0; 41,7; 170,4; 172,1	1,22; 2,35; 2,45	1,22; 1,53; 2,34; 2,45; 7,86
	4	1,53 (m)	1,54 (m)	34,0	33,6	5,05	29,0	1,22; 4,05; 5,05	1,22; 2,34; 2,45; 4,05; 5,05
5	1,21 (s)	1,22 (m)	24,7	24,3	-	29,1	1,53; 1,22	1,53; 1,22; 5,05	
6	1,22 (s)	1,21 (m)	29,0	28,4- 29,0	-	29,30	1,53; 5,05	0,85; 1,53; 5,05	

7	1,22 (s)	1,21 (m)	29,1	28,4- 29,0	-	29,34	1,53; 5,05	0,85; 1,53; 5,05
8	1,22 (s)	1,21 (m)	29,30	28,4- 29,0	-	29,45	1,53; 5,05	0,85; 1,53; 5,05
9	1,22 (s)	1,21 (m)	29,34	28,4- 29,0	-	29,49	1,53; 5,05	0,85; 1,53; 5,05
10	1,22 (s)	1,21 (m)	29,45	28,4- 29,0	-	31,6	1,53; 5,05	0,85; 1,53; 5,05
11	1,22 (s)	1,21 (m)	29,49	28,4- 29,0	-	22,5; 29,3	0,85; 1,26;	0,85; 1,53; 5,05
12	1,26 (s)	1,28 (m)	31,6	31,2	0,85	14,34; 22,5	0,85	0,85; 1,22
13	1,22 (s)	1,21 (m)	22,5	22,0	0,85	14,34; 31,6	0,85	0,85
14	0,85 (m)	0,83 (m)	14,4	13,8	1,22; 1,26	22,5; 31,6	1,22	-

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ¹H e 125 MHz ¹³C com DMSO-*d*₆, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da Surfactina A *normal*-C₁₄ (TANG et al., 2007; ¹H 400 MHz, ¹³C 100 MHz, DMSO-*d*₆; PEYPOUX et al. 1991; ¹H 300 MHz, DMSO-*d*₆). (δ) Deslocamentos químicos em ppm. (-) não identificado.

5.7.3 Determinação estrutural das demais surfactinas por LC-ESI-MS/MS

Amostras Surfactina A1, A3, A4 e A5

As demais amostras Surfactina A1, Surfactina A3, Surfactina A4 e Surfactina A5, isoladas do extrato de *B. amyloliquefaciens* LP164 (Item 4.7.8), semelhantemente apresentaram-se como pós brancos amorfos, para as quatro substâncias seus íons ($[M+H]^+$) foram registrados em m/z 1008,6654, 1022,6748, 1036,6967 e 1050,7049, e às fórmulas moleculares $C_{51}H_{89}N_7O_{13}$, $C_{52}H_{91}N_7O_{13}$, $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$ e $C_{54}H_{95}N_7O_{13}$ respectivamente, analisadas por LC-ESI-MS/MS de alta resolução.

Os espectros de fragmentação dos íons percussores em m/z 1008, 1022, 1036 e 1050 ($[M+H]^+$) das amostras Surfactina A1, A3, A4 e A5 (Figuras 77-80 do material em Anexo), no sistema LC-ESI-MS/MS mostraram duas séries de íons, *b* e *y*. Os íons fragmentos do tipo *y* apresentaram a mesma sequência de aminoácidos já mencionados para a amostra Surfactina A2, mas houve variações de 14 Da ($-CH_2$) na série dos íons fragmentos do tipo *b* N-terminal (Tabela 23). Estes resultados indicaram a natureza homóloga de surfactinas A ou C com C_{13} (Leu/Ileu7), C_{14} (Leu/Ileu7), C_{15} (Leu/Ileu7) e C_{16} (Leu/Ileu7), respectivamente, como descrito na literatura (LIAO et al., 2016). Os dados de fragmentação observados para o íon precursor em m/z 1022,6769 da amostra Surfactina A3 mostraram íons fragmentos semelhantes aos da amostra Surfactina A2, indicando ser isômeros, porém não sendo possível serem distinguidos por espectrometria de massas. Para tal foi realizado experimentos de RMN de 1H , 1D e 2D, para determinar a heterogeneidade da cadeia ácido graxo (*normal*, *iso* e *anteiso*) e isômero, bem como confirmar a sequência dos lipopeptídeos, especialmente devido à alta proporção de leucina e/ou isoleucina na fração peptídica das amostras de surfactinas.

Tabela 23. Íons detectados por fragmentação (LC-ESI-MS/MS) dos homólogos da surfactina a partir dos íons percusores de m/z 1008, 1022, 1036 e 1050.

Produtos da 1ª série (alifática)	*Fragmentos	([M + H] ⁺) (m/z)			
		1008 C ₁₃	1022 C ₁₄	1036 C ₁₅	1050 C ₁₆
Surfactina A2					
([M + H - H ₂ O] ⁺)		990	1004	1018	1032
([M + H - Leu] ⁺)	<i>b</i> ₇	895	909	923	937
([M + H - Leu-Leu] ⁺)	<i>b</i> ₆	782	796	810	824
([M + H - Leu-Leu-Asp] ⁺)	<i>b</i> ₅	667	681	695	709
([M + H - Leu-Leu-Asp-Val] ⁺)	<i>b</i> ₄	568	582	596	610
([M + H - Leu-Leu-Asp-Val-Leu] ⁺)	<i>b</i> ₃	455	469	483	497
([M + H - Leu-Leu-Asp-Val-Leu-Leu] ⁺)	<i>b</i> ₂	342	356	370	384
Produtos da 2ª série (peptídica)					
[M + H - βOH FA-Glu] ⁺	<i>y</i> ₆	685	685	685	685
[M + H - βOH FA-Glu-Leu] ⁺	<i>y</i> ₅	572	572	572	572
[M + H - βOH FA-Glu-Leu-Leu] ⁺	<i>y</i> ₄	459	459	459	459
[M + H - βOH FA-Glu-Leu-Leu-Val] ⁺	<i>y</i> ₃	360	360	360	360
[M + H - βOH FA-Glu-Leu-Leu-Val-Asp] ⁺	<i>y</i> ₂	245	245	245	245
βOH FA = cadeia β-hidroxi ácido graxo					

*Fragmentos: *b* = N-terminal; *y* = C-terminal

5.7.4 Determinação estrutural das demais surfactinas por RMN

Amostras Surfactina A1, A3 e A4

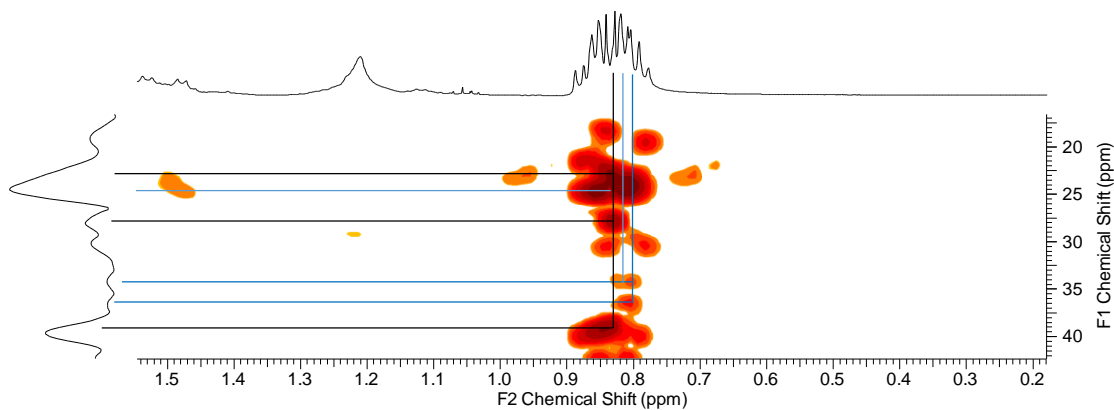
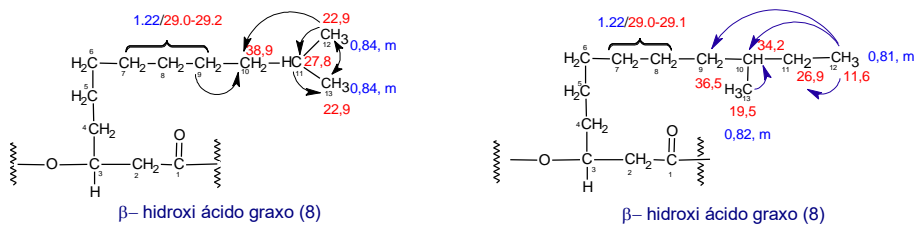
Uma vez determinada a presença em Surfactina A1, A3 e A4 de isoformas das surfactinas A ou C (C₁₃, C₁₄ e C₁₅ respectivamente) pelos dados de espectrometria de massas, os espectros de RMN 1D e 2D das amostras foram obtidos com a finalidade de ratificar esta presença e determinar de qual ou quais das isoformas se tratam. Os espectros de RMN de ¹H (Figuras 81-83, respectivamente do material em Anexo) e as correlações observadas nos HMBCs revelaram que as substâncias das amostras Surfactina A1, A3 e A4 são compostas da mesma sequência de aminoácido da amostra Surfactina A2 e diferenciam-se por possuir uma cadeia lateral, ligada ao carbono metínico, adjacente a lactona), indicando serem todas classificadas como surfactina A,

com Leu na posição 7 da sequência peptídica (β OH FA-Glu¹-Leu²-Leu³-Val⁴-Asp⁵-Leu⁶-Leu⁷).

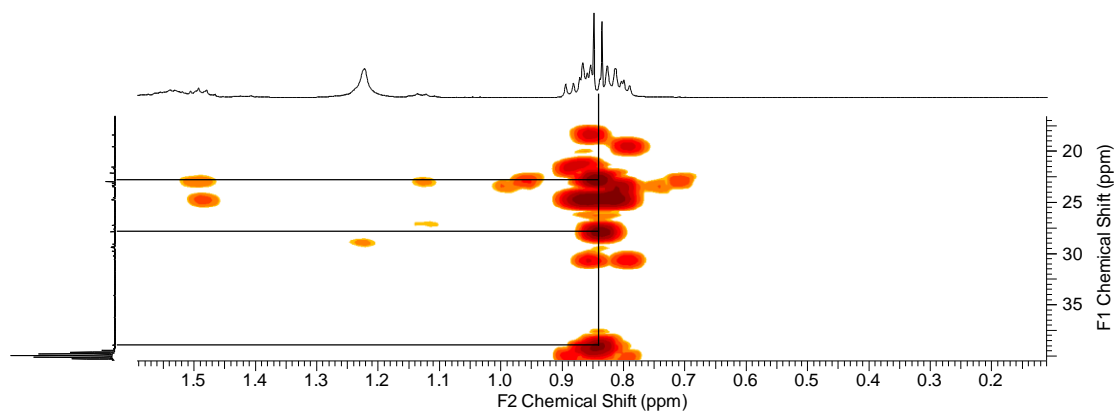
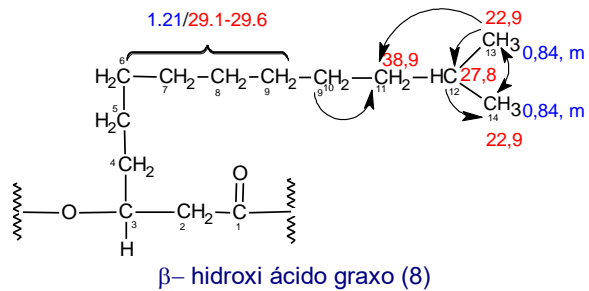
O mapa de correlação HMBC da amostra Surfactina A1 (Figura 46a), revelou a presença de uma mistura das surfactinas A (C₁₃) com um grupo terminal isopropil (*iso*) e um outro *sec*-butil (*anteiso*). As correlações do sinal em δ 0,84 (H-13) com os sinais dos carbonos em δ 22,9, δ 27,8 e δ 38,9 (C-12, C-11 e C-10, respectivamente) indicam que a cadeia lateral β -OH ácido graxo para a surfactina A (C₁₃) *iso* é $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. As correlações do sinal em δ 0,81 (H-12) com os sinais dos carbonos em δ 34,2 e δ 36,5 (C-10 e C-9, respectivamente) e o sinal em δ 0,82 (H-13) correlacionando com o sinal em δ 34,2 (C-10) indicam que a cadeia lateral β -OH ácido graxo para a surfactina A (C₁₃) *anteiso* é $-(\text{CH}_2)_6\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$.

As correlações HMBC para a amostra Surfactina A3 (Figura 46b), apresentam um grupo terminal isopropil. O sinal em δ 0,84 (H-14) correlaciona com os sinais dos carbonos em δ 22,9, 27,8 e 38,9 (C-13, C-12 e C-11, respectivamente), indicando que a cadeia lateral β -OH ácido graxo para a surfactina A (C₁₄) *iso* é $-(\text{CH}_2)_8\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. Para a amostra Surfactina A4 (Figura 46c) os dados de HMBC revelam a presença de uma mistura das surfactinas A (C₁₅) *iso* e *anteiso* observando-se: correlações do sinal em δ 0,83 (H-15) com os sinais dos carbonos em δ 22,9, δ 27,8 e δ 38,9 (C-14, C-13 e C-12, respectivamente), indicando que a cadeia β -OH ácido graxo para a surfactina A (C₁₅) *iso* é $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; e correlações do sinal em δ 0,83 (H-14) com os sinais dos carbonos em δ 34,2 e δ 36,5 (C-12 e C-11, respectivamente) e o sinal em δ 0,84 (H-15) correlacionando com o sinal em δ 34,2 (C-12), indicando que a cadeia lateral β -OH ácido graxo para a surfactina A (C₁₅) *anteiso* é $-(\text{CH}_2)_8\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$. Todas as atribuições de ressonância 1D e 2D, para as amostras Surfactina A1, A3 e A4 estão resumidas nas Tabelas 30-32 respectivamente do material em Anexo.

a)



b)



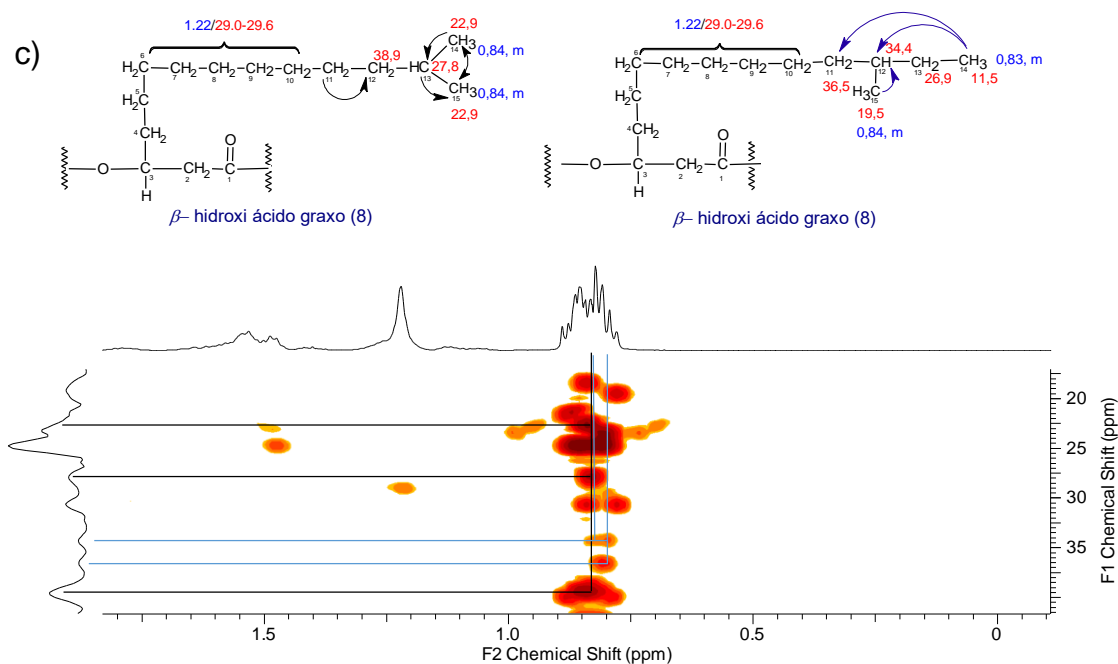


Figura 46. Mapas de correlação de ^1H - ^{13}C HMBC em DMSO- d_6 (500 MHz), ampliação das regiões dos grupos da cadeia laterais β -OH ácido graxo. (a) Surfactina A1 (b) Surfactina A3 e (c) Surfactina A4.

5.7.5 Determinação estrutural das iturinas por LC-ESI-MS/MS

Amostra Iturina A1

A amostra Iturina A1 isolada do extrato de *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164) (Item 4.7.7) apresentou-se como um pó branco amorfo, correspondente a uma substância pura de massa molecular 1042.5525 e fórmula molecular $\text{C}_{48}\text{H}_{75}\text{N}_{12}\text{O}_{14}$, de acordo com as análises por LC-ESI-MS/MS de alta resolução, em que foi observado o íon em m/z 1043,5545 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

No espectro de fragmentação do íon precursor em m/z 1043,5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) da amostra Iturina A1 (Figura 47), no sistema LC-ESI-MS/MS, foram observados uma série de íons fragmentos que permitiram obter a sequência Pro⁵-Asn⁶-Ser⁷- β AA-Asn¹-Tyr²-Asn³-Gln⁴-CO⁺ (β AA significa β -amino ácido graxo), coerente com uma iturina clivada na ligação peptídica entre Pro⁵ e Gln⁴. Os íons fragmentos do tipo *b* foram detectados em m/z 98 (b1), m/z 212 (b2), m/z 299 (b3), m/z 524 (b4), m/z 638 (b5), m/z 801 (b6) e m/z 915 (b7) e os íons fragmentos do tipo *y* em m/z 219 (y1), m/z 243 (y2), m/z 406 (y3), m/z 520 (y4),

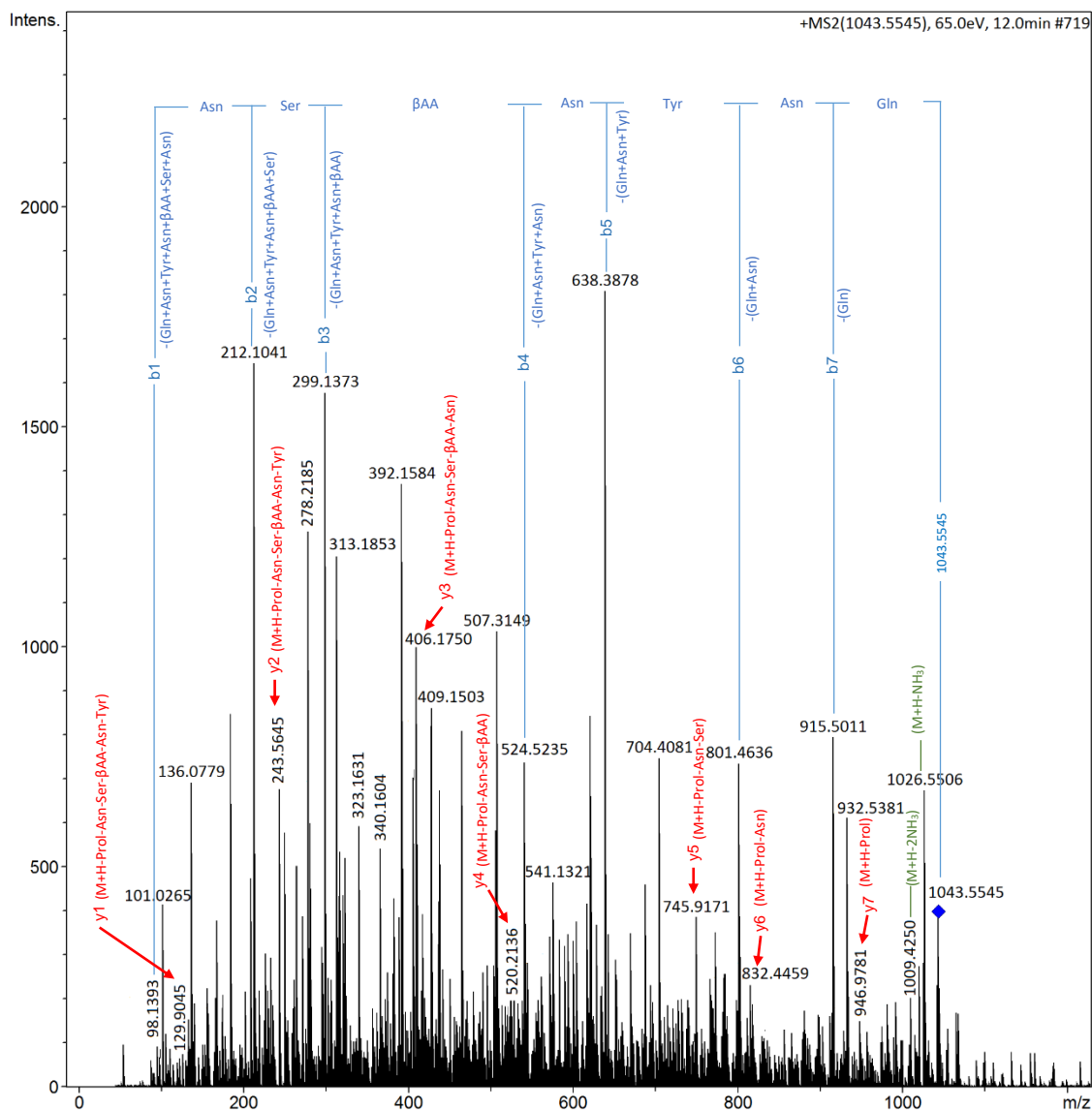
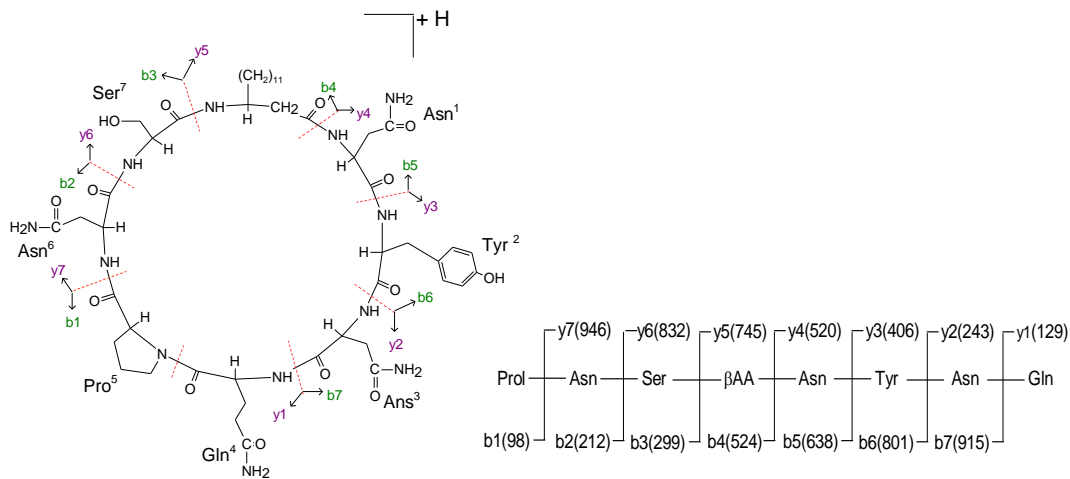


Figura 47. Espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+$ em m/z 1043,5545, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra *B. amyloliquefaciens* PpC1 2.2b (LP164), e respectiva proposta de fragmentação para a isoforma iturina A (C₁₄).

m/z 745 (y5), m/z 832 (y6) e m/z 946 (y7).

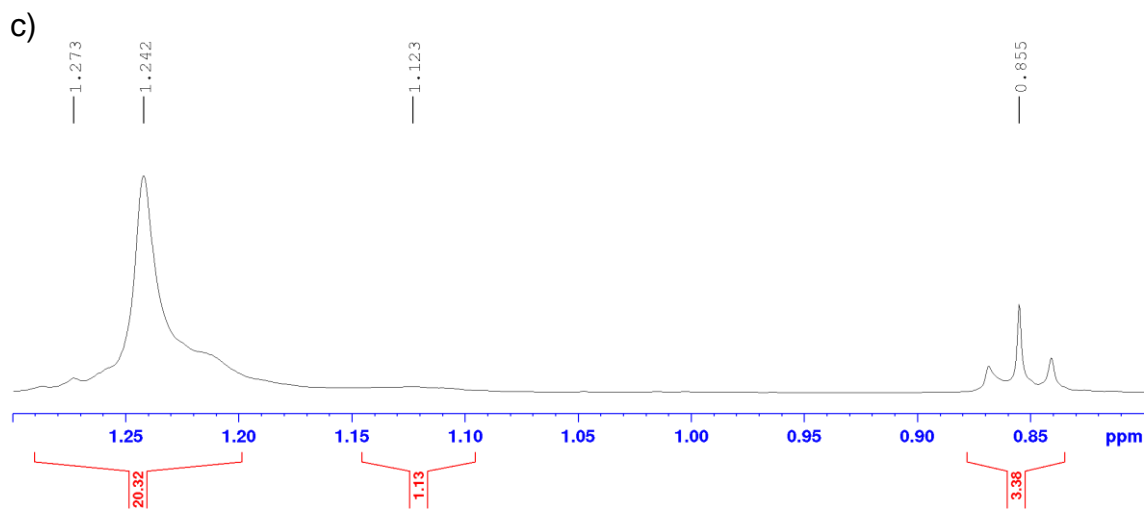
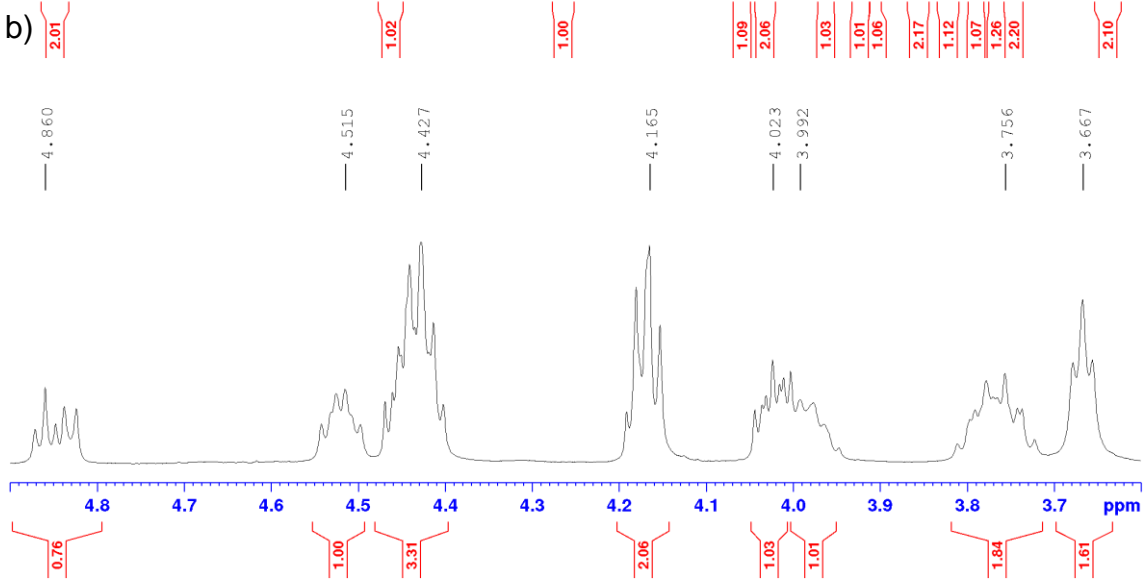
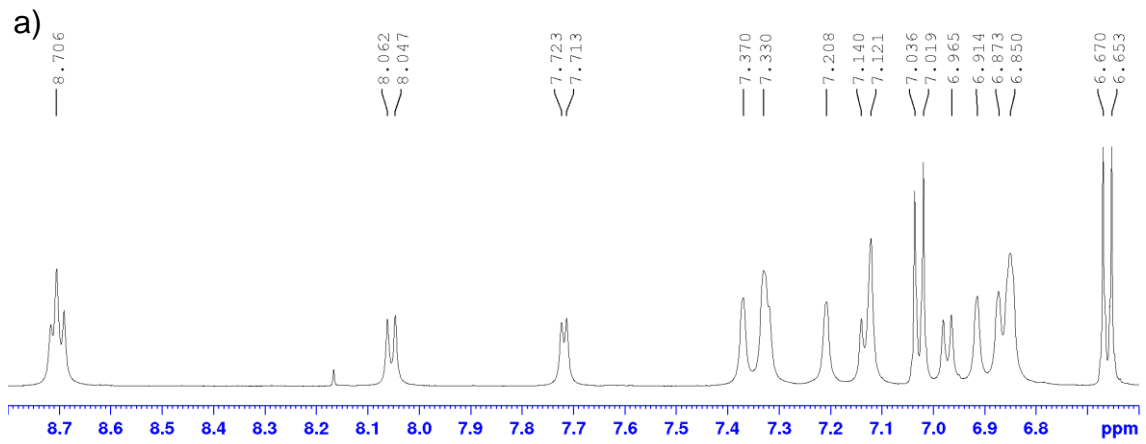
Ainda no espectro de LC-ESI-MS/MS do íon em m/z 1043,5 foram observados íons imônio de m/z 101 (Gln) e m/z 136 (Try), íons com perda de H₂O de m/z 409 (Asn+Ser+βAA-H₂O)⁺ ou NH₃ de m/z 323 (βAA+Asn-NH₃)⁺ e íons de fragmentação interna observados em m/z 541 (Asn+Ser+βAA+Asn)⁺, m/z 392 (Asn+Tyr+Asn)⁺, m/z 340 (βAA+Asn)⁺, m/z 313 (Ser+βAA)⁺ e m/z 278 (Tyr+Asn)⁺. Outros íons principais também foram detectados, incluindo m/z 1026 (M+H-NH₃)⁺, m/z 1009 (M+H-2NH₃)⁺ e m/z 932 (M+H-Gln+H₂O)⁺.

De acordo com estes fragmentos, típicos de CID, a sequência observada é coerente com o íon de uma das isoformas da iturina A (C₁₄), após a abertura do anel na ligação Pro⁵ e Gln⁴ (Figura 47). Para confirmar a sequência peptídica deste lipopeptídeo, bem como a heterogeneidade da cadeia ácido graxo (*normal*, *iso* e *anteiso*) foram realizadas análises de RMN de ¹³C e de ¹H, 1D e 2D.

5.7.6 Determinação estrutural das iturinas por RMN

Amostra Iturina A1

No espectro de RMN de ¹H em DMSO-*d*₆ a 500 MHz da amostra Iturina A1 foram registrados sinais que confirmam a presença de cadeia longa alifática (CH₂ em δ 1,53-1,24) e sinais que confirmam o esqueleto peptídico, a saber: 4 sinais de hidrogênios α-metínicos comuns em ligações peptídicas (integrados para 8 H-C, em δ 4,51-3,99) e 10 sinais característicos dos hidrogênios ligados a N (integrados para 7 H-N e 8 H₂-N em δ 8,70-6,87) (Figura 48). Além disso, estão presentes entre δ 2,8 e 1,0 os sinais característicos dos hidrogênios alifáticos (CH₂, β e γ), em δ 0,85 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H) um grupo metil (CH₃) terminal (Figura 48) e em δ 7,02 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H) e δ 6,66 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H) dois pares de dupletos referentes a um anel benzeno *para*-dissubstituído (Figura 49).



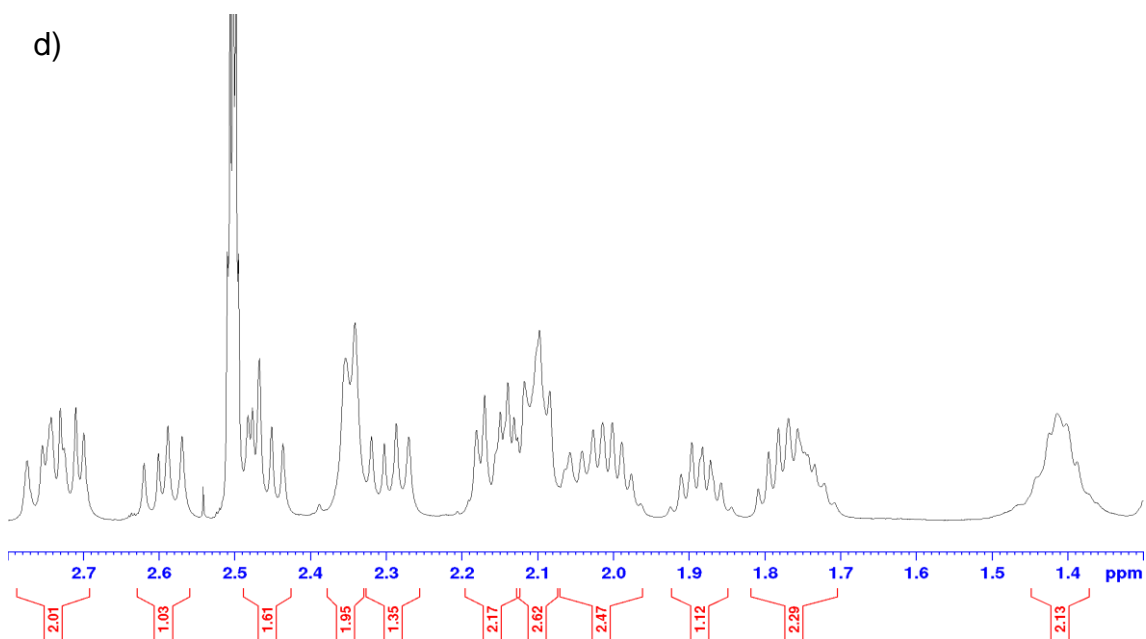


Figura 48. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Iturina A1 em DMSO – d_6 (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N e aromáticos b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos, c) hidrogênios metilênicos e metílicos, d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH_2 , β e γ).

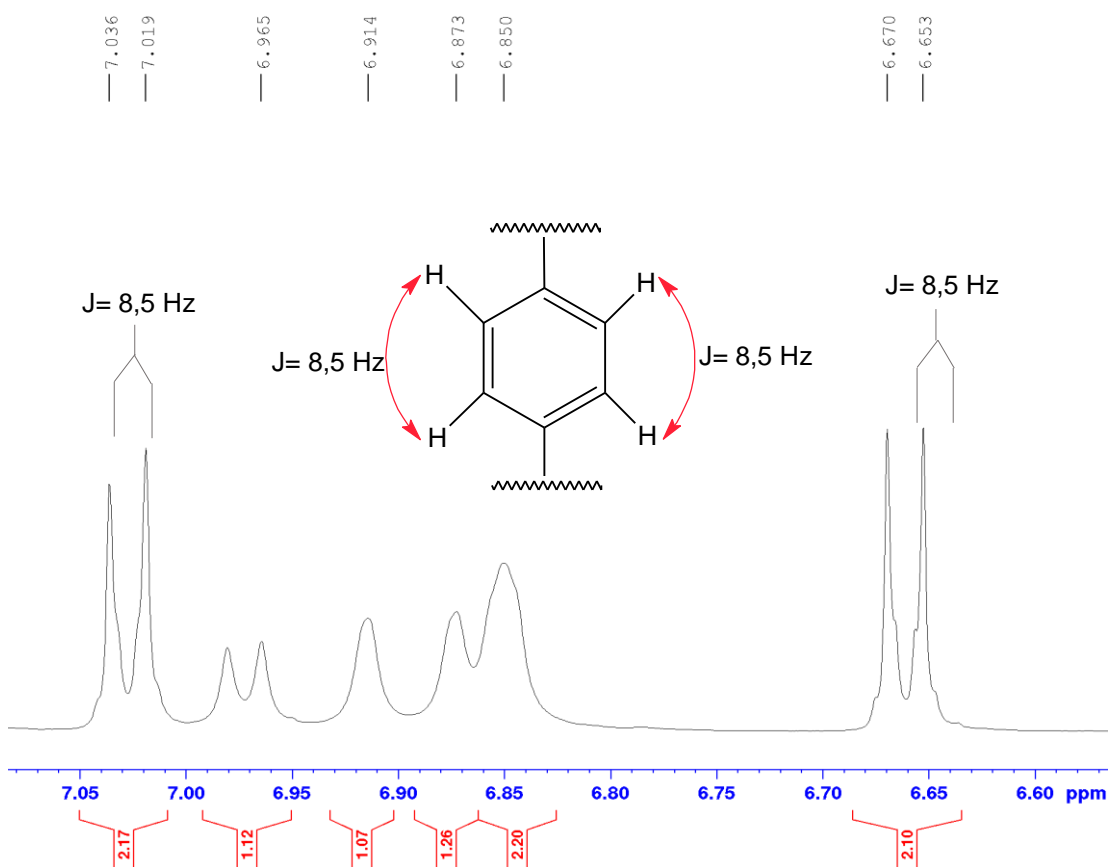


Figura 49. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da amostra Iturina A1 em DMSO- d_6 (500 MHz) da região aromática do resíduo de aminoácido Tyr.

No espectro de RMN de ^{13}C de Iturina A1 (Figura 50), também coerente com uma das isoformas das iturinas A (C_{14}) (HIRADATE et al., 2002), foram observados sinais dos grupos metilênicos da cadeia lipídica em δ 31,7-22,0, grupos carbonila, em δ 174,5-170,7, carbonos aromáticos de benzeno *para*-dissubstituído em δ 156,2-115,5, sinais de carbonos metínicos α -carbonílicos peptídicos em δ 61,2-50,1, um sinal de carbono oximetilênico em δ 61,8, além dos outros sinais de carbonos metínicos e metilênicos em δ 47,0-22,5, e metílico, em δ 14,4. O espectro de ^{13}C , juntamente com o DEPT-135 (Figura 51), como era esperado, apresentaram 5 sinais de carbonos metínicos (correspondentes a 8 grupos CH), 19 de metilênicos (correspondentes a 21 grupos CH_2), 1 sinal de carbono metílico e 11 de carbonos carbonílicos (correspondentes a 12 grupos $\text{C}=\text{O}$), podendo ser atribuídos às carbonilas dos resíduos de aminoácido.

A identificação mais precisa da amostra Iturina A1 envolveu a análise dos mapas de correlação de COSY, TOCSY e NOESY (Figura 52-54). O COSY (Figura 52) mostrou as correlações HN- $\text{HC}\alpha$ com apenas sete grupos de aminoácidos, indicando a presença de prolina, uma vez que, a mesma tem uma estrutura cíclica alifática e seu N α -amínico está ligado a dois átomos de carbono. Esta confirmação foi possível a partir do experimento TOCSY (Figura 53), em que as correlações observadas caracterizam sete resíduos de aminoácidos e um resíduo amino ácido graxo da cadeia lipídica a saber: asparagina (Asn) (3x), tirosina (Tyr), serina (Ser), glutamina (Gln), prolina (Prol) e β -amino ácido graxo (βAA). Também foram observadas correlações do sinal em δ 7,14 (HN) com os sinais em 2,34 (H-36'), δ 3,99 (H-37'), e 1,41 (H-38'), revelando a presença do β -amino ácido graxo. Ainda no mapa de correlação TOCSY na região dos sinais entre δ 7,32-6,85 foram observadas correlações que caracterizam quatro grupos amidas terminais dos resíduos de aminoácidos Asn (3x) e Gln (Figura 53 e Tabela 23). As correlações do sinal em δ 4,17 (H-23) com os sinais δ 2,13 e 1,78 (H-24, H-24'), 1,98, e 1,88 (H-25, H-25') e 3,76 (H-26) indicaram a presença do aminoácido prolina na sequência do ciclo peptídico (Figura 53).

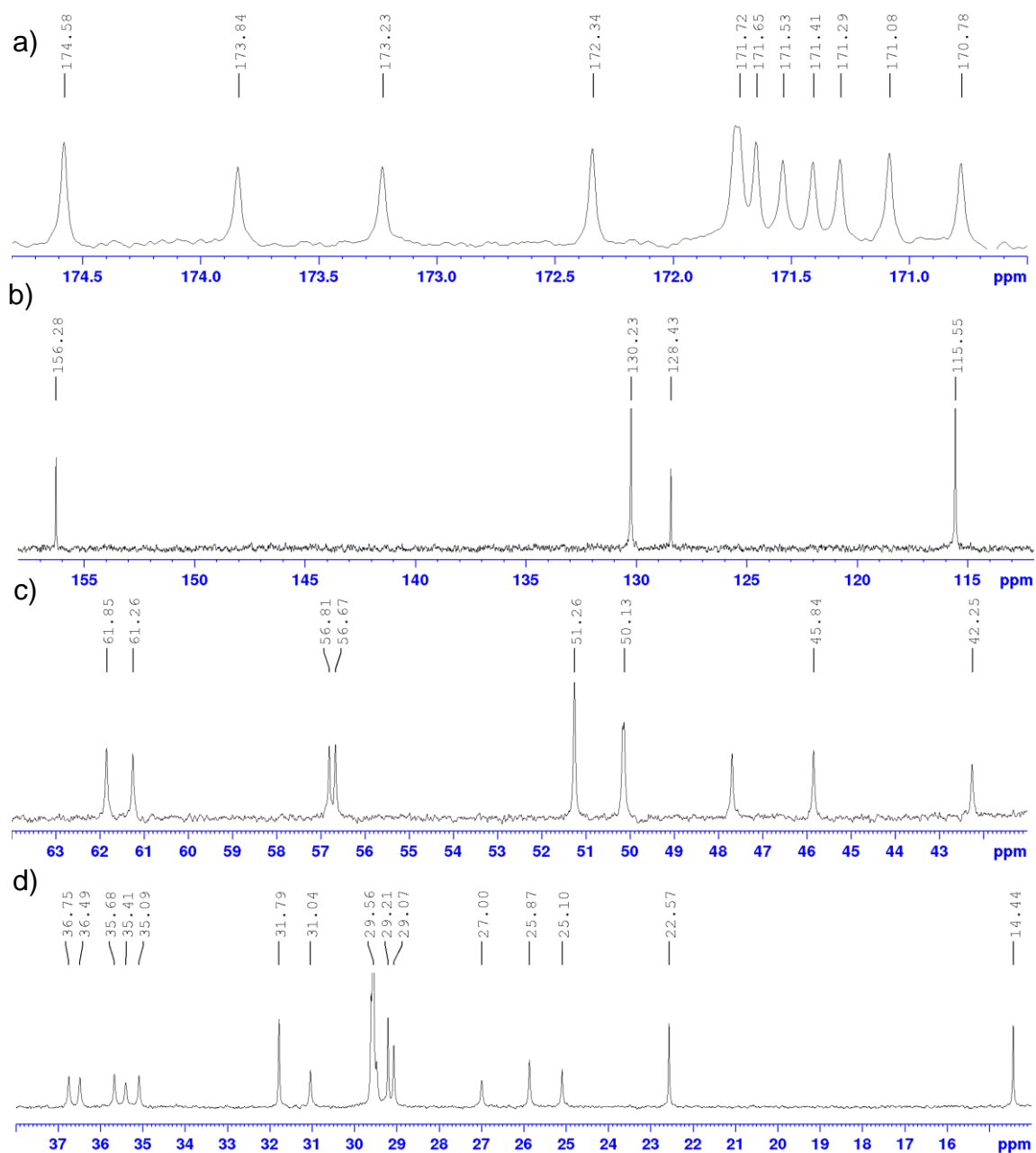


Figura 50. Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C da amostra Iturina A1 em $\text{DMSO} - d_6$ (125 MHz): a) região dos carbonos carbonílicos, b) carbonos aromáticos de benzeno *para*-dissubstituído c) carbonos metínicos, metilênicos e oximetilênico d) carbonos metilênicos e metílico.

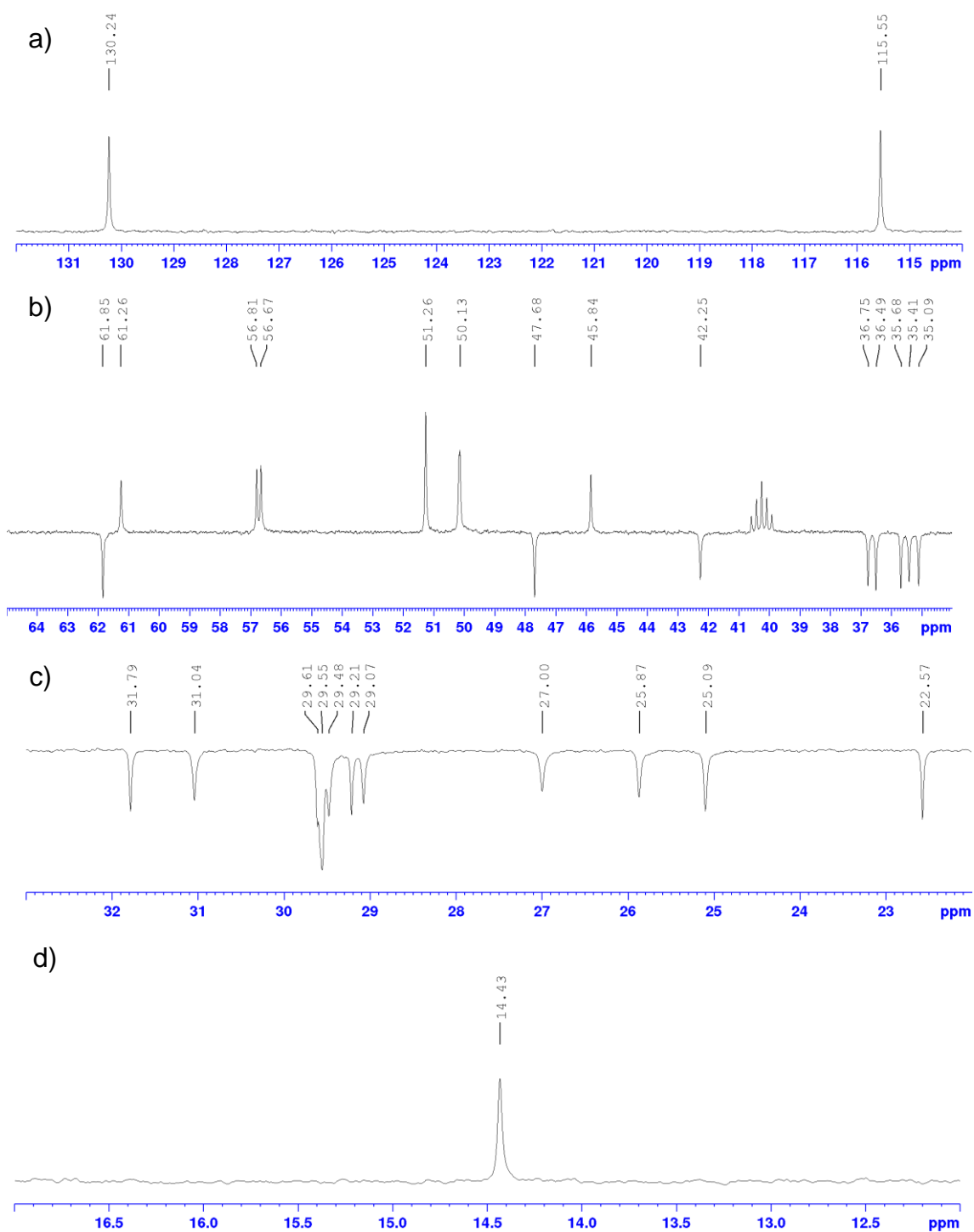


Figura 51. Espectro de DEPT 135° da substância Iturina A1 em DMSO-*d*₆ (125 MHz). a) carbonos aromáticos de benzeno *para*-dissubstituído b) carbonos metínicos, metilênicos e oximetilênico c) carbonos metilênicos e d) carbono metílico.

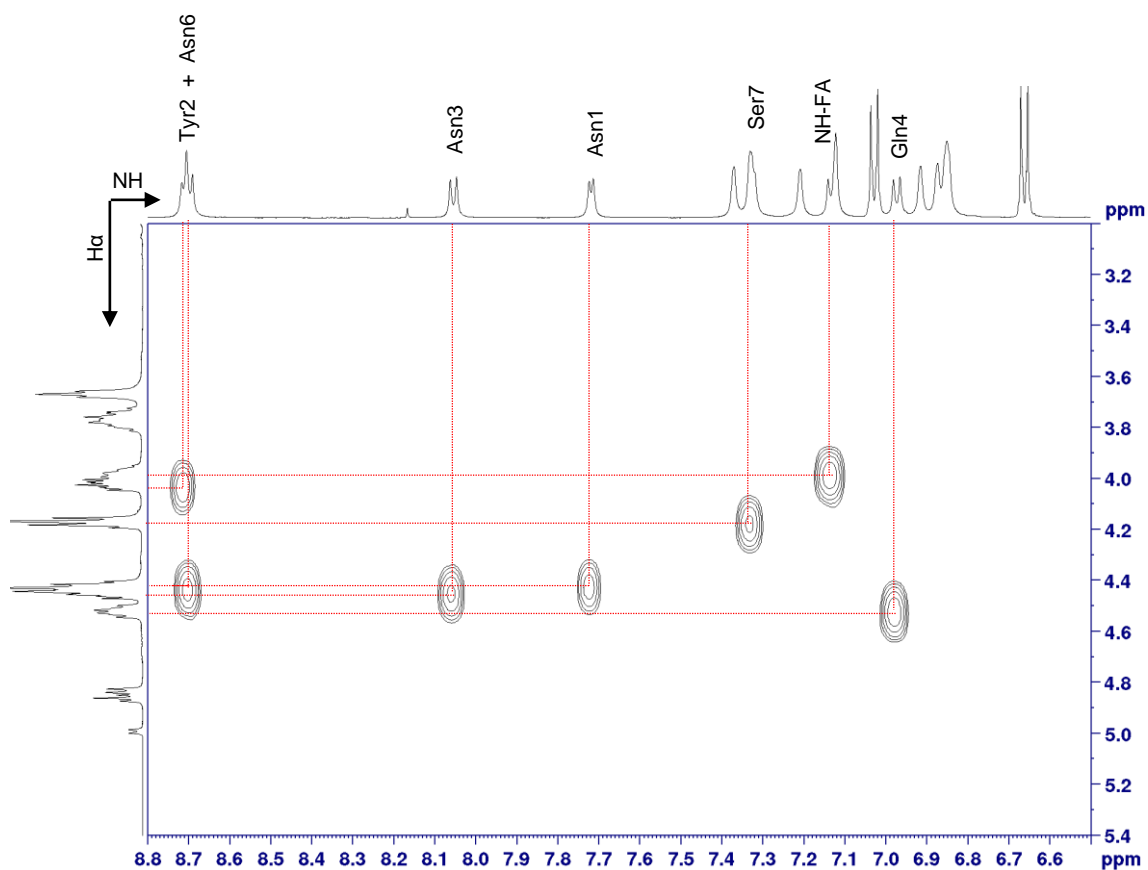
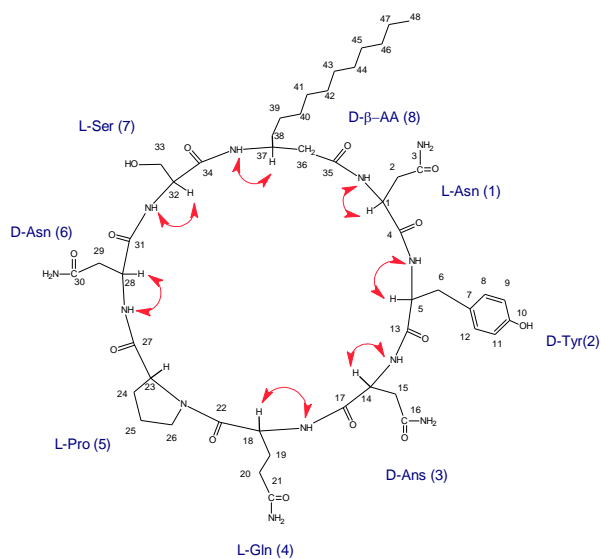


Figura 52. Correlações homonucleares $^1\text{H} - ^1\text{H}$ observadas no experimento de COSY para os hidrogênios NH-CH α da amostra Iturina A1 em DMSO- d_6 (500 MHz).

Em seguida, as sequências dos resíduos dos aminoácidos e o macrociclo foram atribuídos pelo experimento NOESY (Figura 54 e Figura 55) através de correlações espaciais dos resíduos sequencialmente adjacentes, das quais destacamos: a correlação do sinal em δ 7,14 (**HN**) do ácido graxo β -amino com δ 7,71 (**HN**) do Asn 1; deste sinal com o sinal em δ 8,70 (**HN**) da Tyr 2; deste com o sinal em δ 8,05 (**HN**) de Asn 3, que correlaciona também com o sinal em δ 6,97 (**HN**) de Gln 4; do sinal deste mesmo aminoácido em δ 4,51 (**HC α**) com o sinal em δ 3,76 (**HC δ**) de Prol 5, o qual também se correlaciona com o sinal em δ 4,17 (**HC α**) do mesmo aminoácido de Prol 5; deste com o sinal em δ 8,70 (**HN**) de Asn 6, o qual se correlaciona com o sinal em δ 7,32 (**HN**) da Ser 7; e completando o macrociclo, este mesmo sinal correlaciona-se com o sinal em δ 7,14 (**HN**) da cadeia do β -amino ácido graxo (Tabela 23). Uma vez que a atribuição das correlações dos hidrogênios (**HN/HN/HC α**) de cada resíduo foi realizada, os mapas de correlação ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC permitiram a atribuição dos carbonos protonados e quaternários correspondentes (Tabela 23). No HSQC (Figura 56) foram observadas as correlações que caracterizam os hidrogênios e carbonos α (**HC α**) dos resíduos de aminoácido asparagina (Asn) (3x), tirosina (Tyr), serina (Ser), glutamina (Gln), prolina (Prol) e β -amino ácido graxo (β AA). Também foram observadas as correlações que caracterizam o resíduo de aminoácido prolina a saber: em δ 4,17 (**HC α**) de Prol correlacionando com o sinal em δ 61,2 (C-23), em δ 2,13 e 1,78 (**H β '**, **H β ''**) correlacionando com δ 29,5 (C-24), em δ 1,98 e 1,88 (**H γ '**, **H γ ''**) correlacionando com o sinal em δ 25,0 (C-25) e em δ 3,76 (**H δ**) correlacionando com δ 47,6 (C-26).

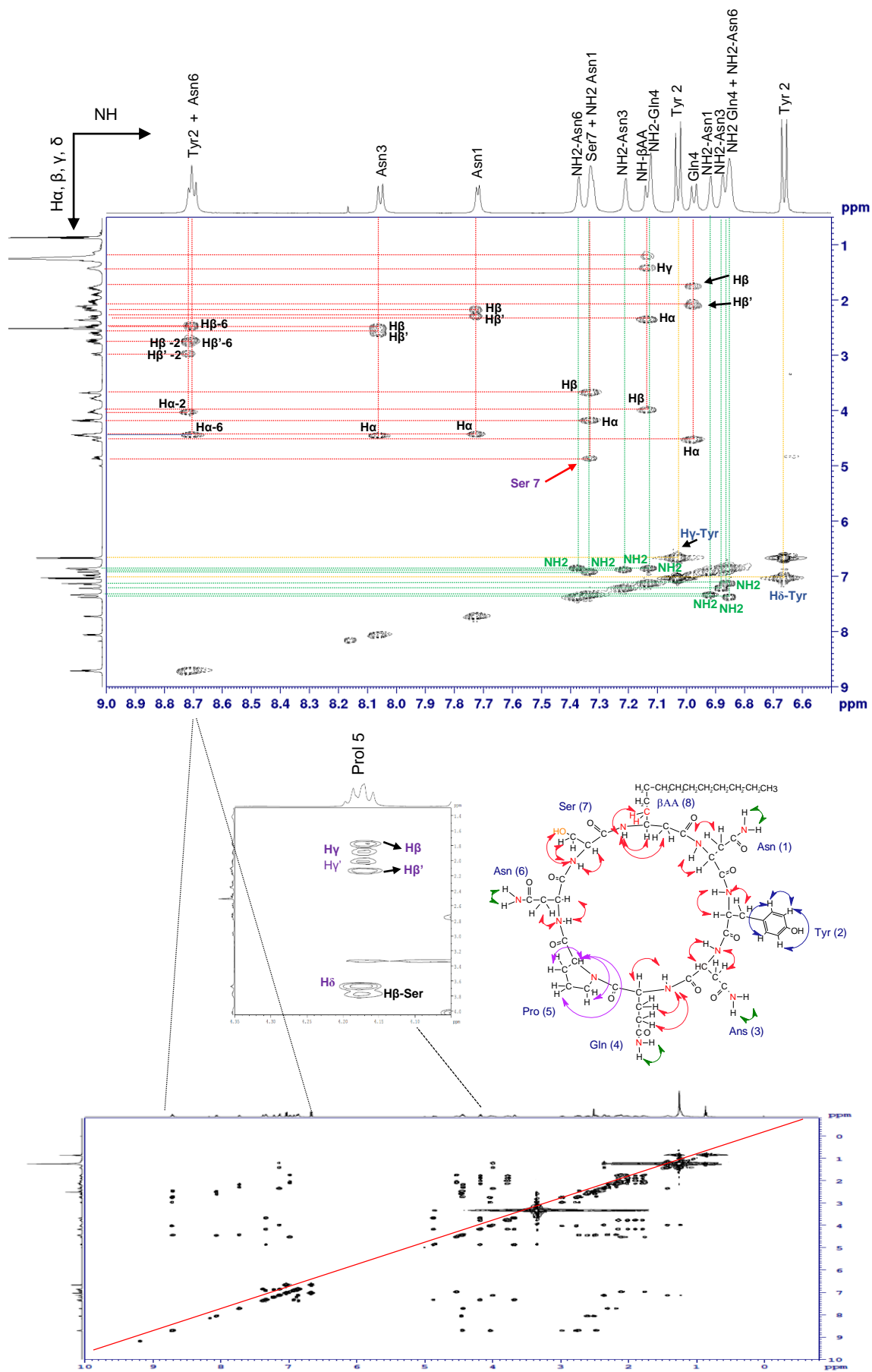


Figura 53. Espectro de ^1H – ^1H do TOCSY e ampliação das regiões NH/ H α , β , γ , e δ da substância Iturina A1 em DMSO-*d*₆ (500 MHz).

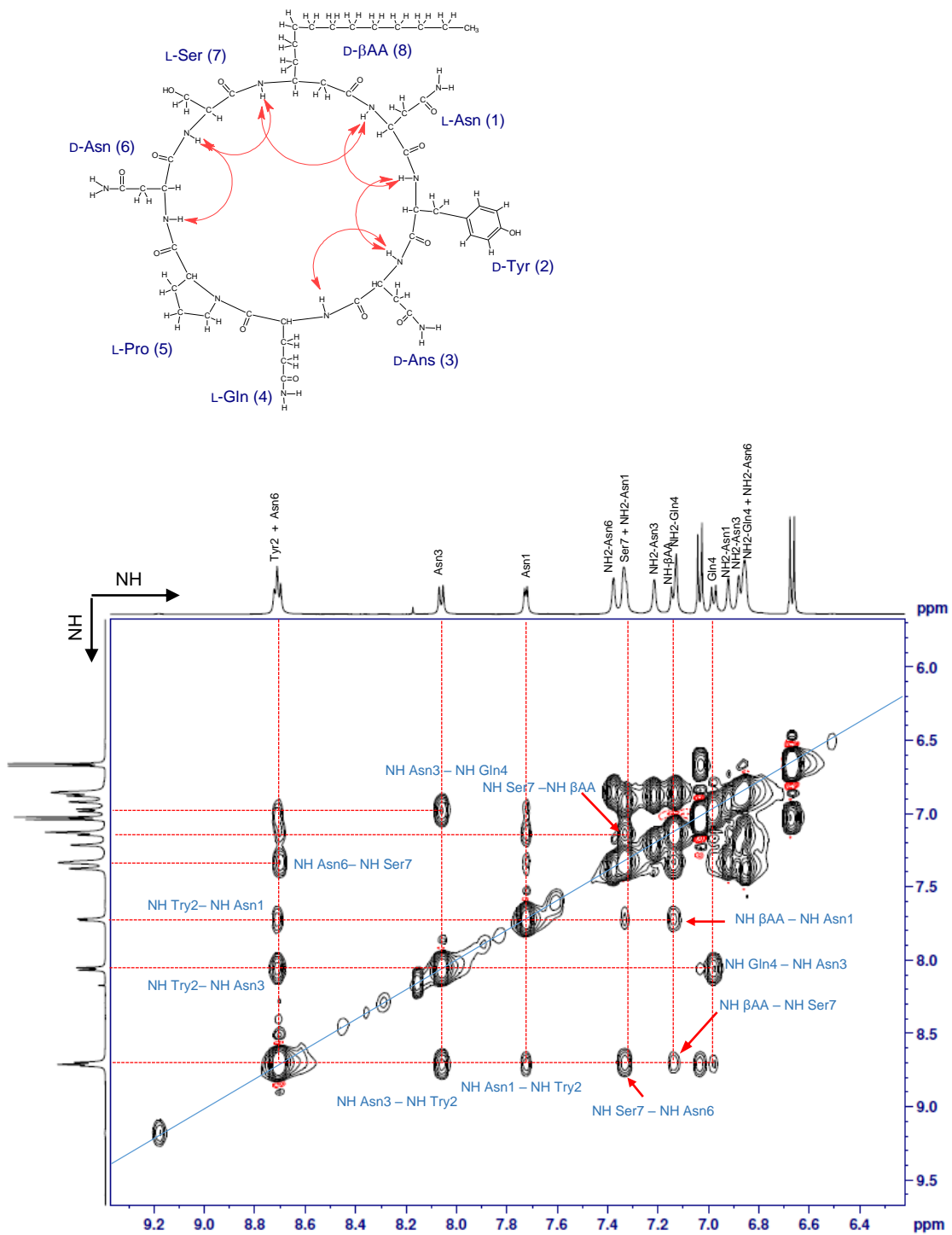


Figura 54. Ampliação das regiões NH/NH de $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de NOESY da substância Iturina A1 em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).

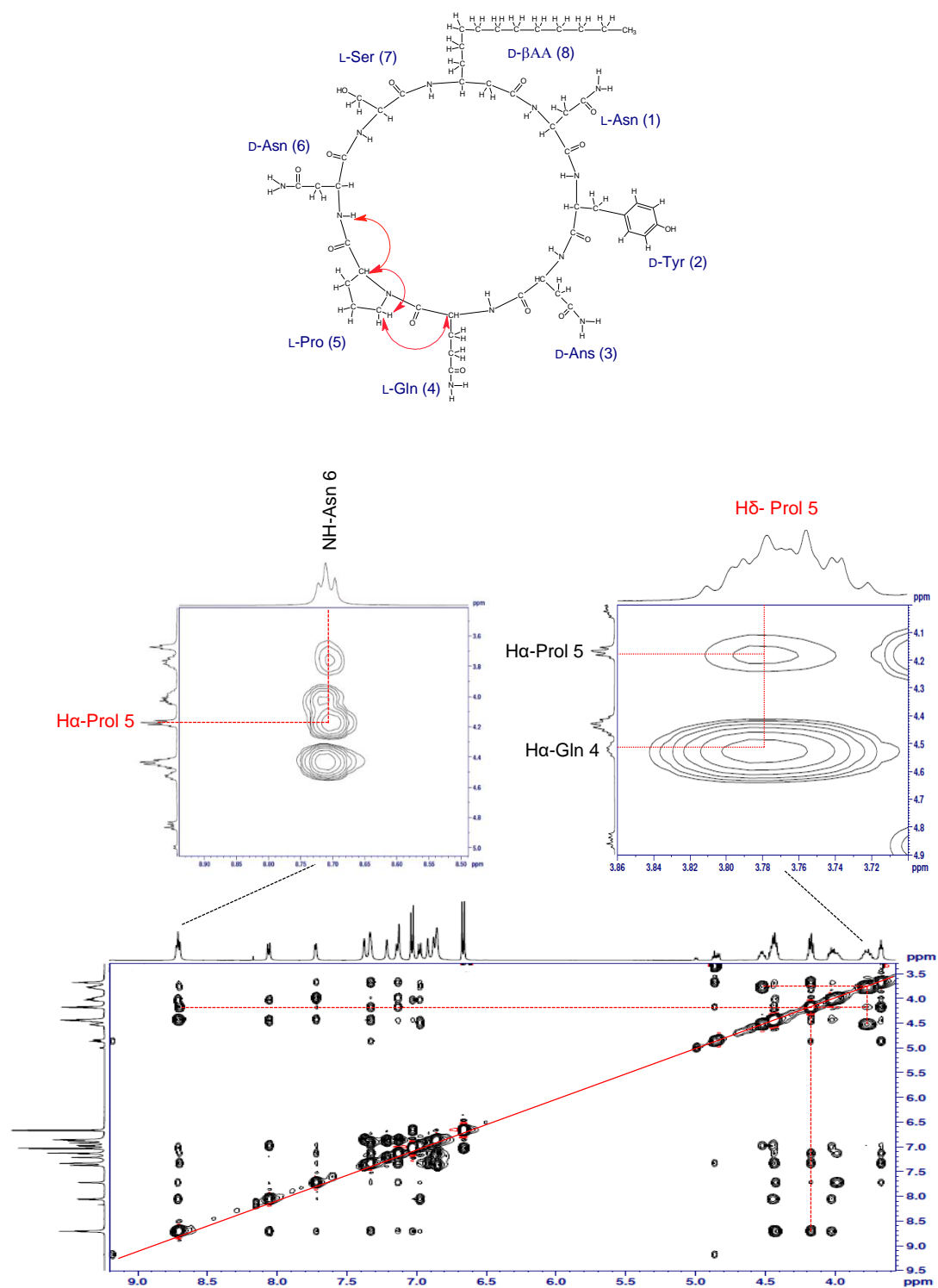


Figura 55. Ampliação das regiões NH/ H_α, β, γ, e δ de ¹H – ¹H de NOESY da substância Iturina A1 em DMSO-*d*₆ (500 MHz).

Ainda no HSQC foram observados os dois sinais de carbono em δ 42,2 (C-36) e δ 45,8 (C-37) característicos de um β -aminoácido dos lipopeptídeos iturínicos (KAJIMURA et al., 1995), os quais foram atribuídos ao α -CH₂ (C-36) e β -CH (C-37), adjacente ao NH da cadeia β -amino ácido graxo. Observou-se também que as correlações HSQC (Figura 56) dos sinais de carbono em δ 61,8 (metileno, C-33) e 56,6 (metino, C-32) mostraram fortes correlações para o resíduo de serina, confirmada também pelas correlações observadas no experimento TOCSY.

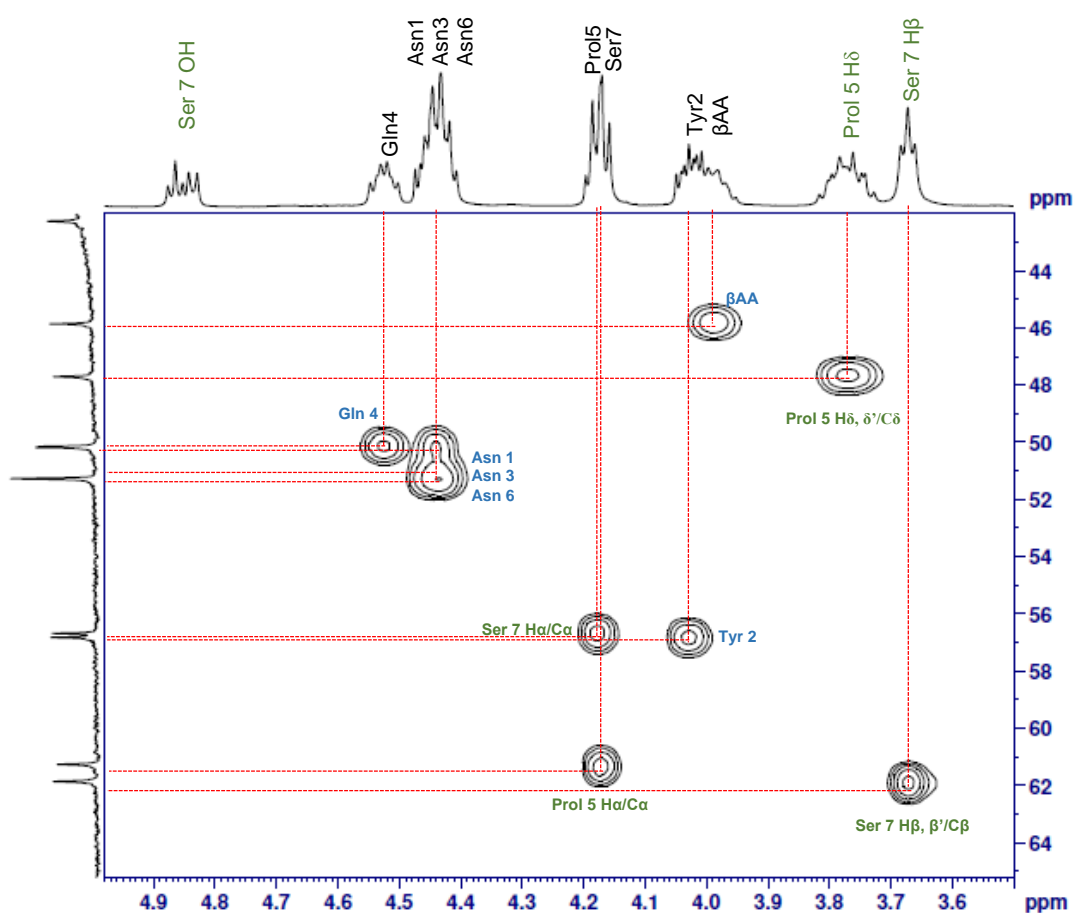


Figura 56. Ampliação da região CH/H α , β e δ do mapa de correlação ¹H – ¹³C de HSQC da substância Iturina A1 em DMSO-*d*6 (500 MHz).

Com base no mapa de contorno HMBC, foi possível confirmar as carbonilas peptídicas e das amidas contidas nos grupos Gln e Asn a partir de correlações

entre os sinais δ 7,32- 6,85 com os carbonos carbonílicos em δ 174,5-171,2 (Figura 57 e Tabela 23).

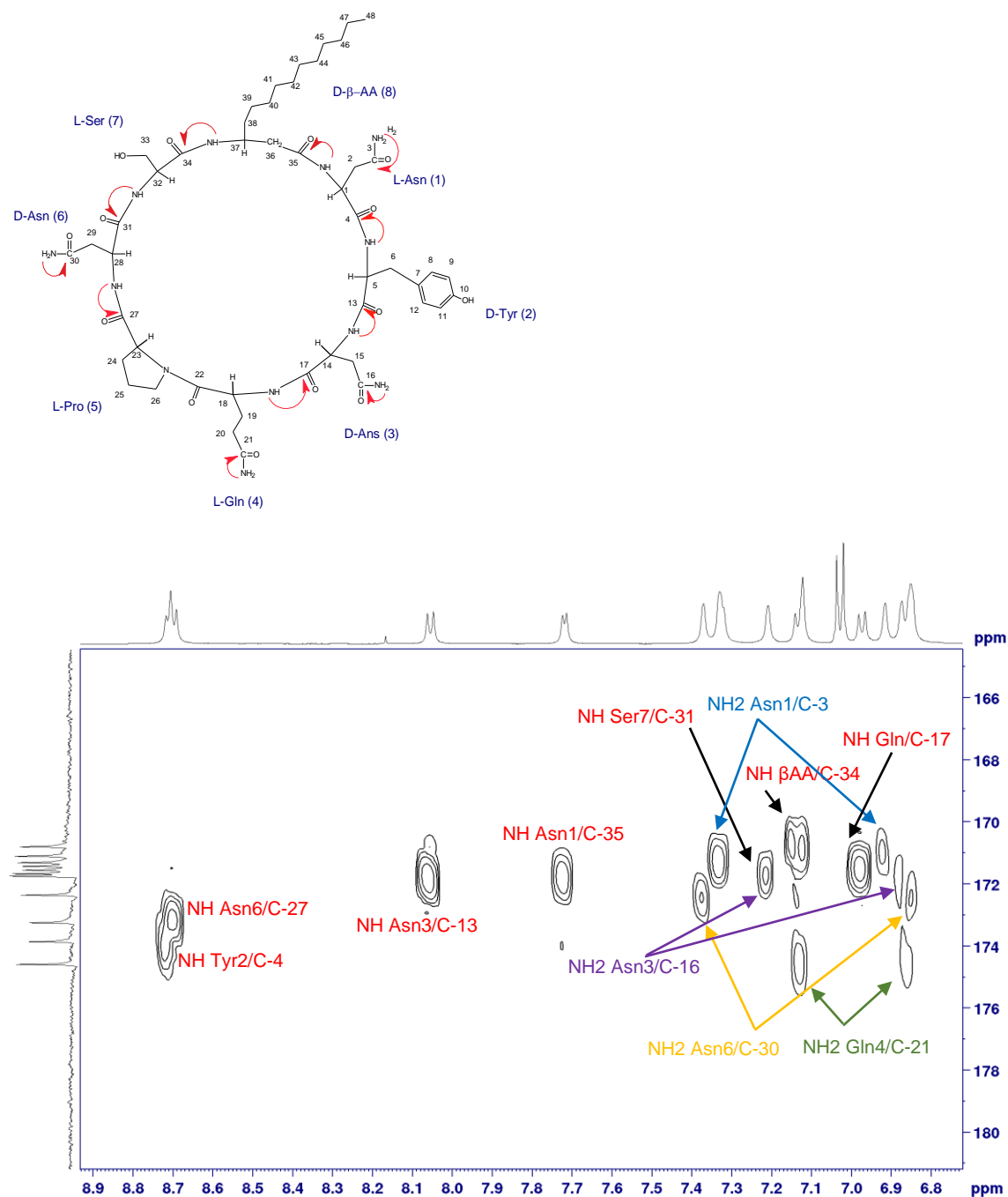


Figura 57. Ampliação do mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de HMBC da substância Iturina A1 em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).

O carbono metil terminal da cadeia lipídica, em δ 14,4, bem como os hidrogênios geminais em δ 0,85 (3H, t) do espectro de RMN de ^1H e suas correlações no HMBC (Figura 58) com carbonos em δ 22,5 e δ 31,7, indicaram

que a amostra Iturina A1 é uma isorforma da surfactina A (*normal-C₁₄*). Todas as atribuições de RMN 1D e 2D para Iturina A1 estão resumidas na Tabela 24.

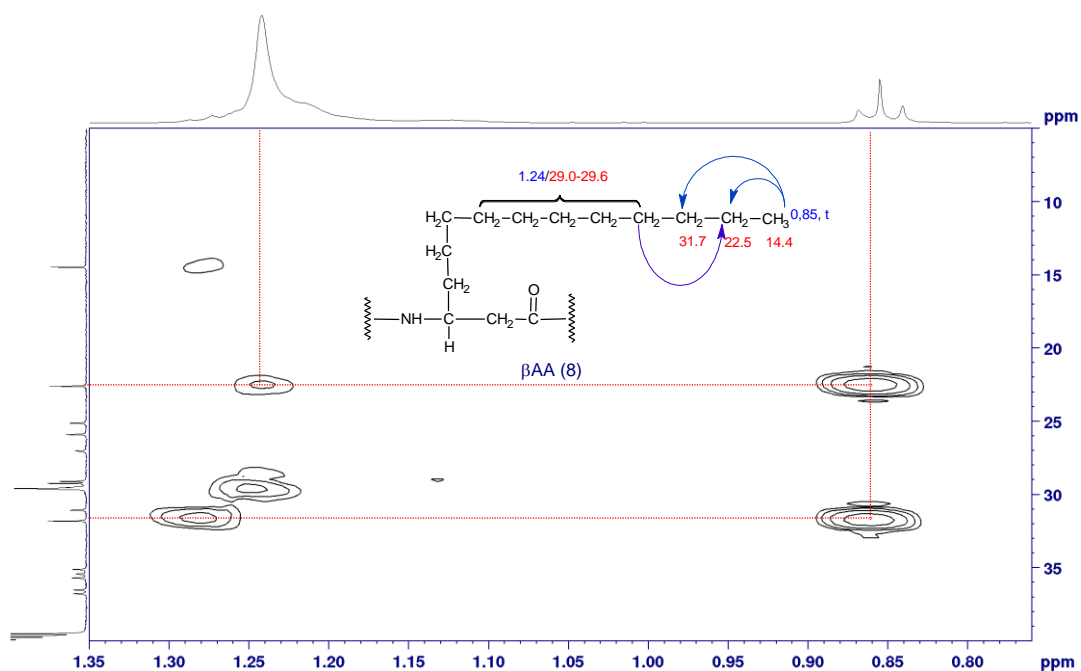


Figura 58. Ampliação do mapa de correlação ¹H-¹³C HMBC correspondente ao final da cadeia do β-amino ácido graxo da substância Iturina A1 em DMSO-*d*₆ (500 MHz).

Tabela 24. Dados de RMN1De 2D da amostra Iturina A1 – Iturina A (*normal-C*₁₄).

Amino ácido	Posição	¹ H δ (mult., J em Hz) ^a	¹ H δ (mult., J em Hz) ^b	¹³ C/HSQC (δ) ^a	¹³ C (δ) ^b	COSY (¹ H- ¹ H) ^a	HMBC (¹ H- ¹³ C) ^a	NOESY ^a	TOCSY ^a
Asn¹	1	4,43 (2H, m)	4,42 (2H,m)	51,2	50,8	2,29; 7,71	173,8	2,17; 7.32; 7,71	2,17; 2,29; 7,71
	2	2,29 (1H, dd, 15,8 e 8,4)/	2,29 (1H, dd, 15,8, 8,4)	36,7	36,3	2,17; 4,43	51,2; 171,2	4,43; 7,71	4,43; 7,71
		2,17 (1H, d)	2,16 (1H, dd)	36,7	36,3	4,43	51,2; 171,2	4,43; 7,71	4,43; 7,71
	3			171,2	170,6				
	4			173,8	173,3				
	1-NH	7,71 (1H, s)	7,70 (1H, d)	-	-	4,43	36,7; 51,2; 171,6	2,34; 3,66; 3,99; 4,43	2,17; 2,29; 4,43
	3-NH ₂	7,32 (1H, s)/ 6,91 (1 H, s)	7,31 (1H, s) 6,89 (1H, s)	-	-		61,8; 171,2 36,7;171,2	4,17; 7,12 7,32	6,91/7,32 7,32
Tyr²	5	4,03 (1H, m)	4,02 (1H,m)	56,8	56,3	2,73; 8,70	35,4; 42,2; 61,2; 128,5; 171,7	2,76; 2,96; 7,02; 8,05; 8,70	2,76; 2,96; 8,70
	6	2,96 (1H, dd, 14,3 e 3,7)	2,96 (1H, dd, 14,3 e 3,7)	35,4	34,9	2,73; 4,03	56,8; 128,4; 130,2; 171,7	2,73; 4,03; 8,70	2,73; 4,03; 8,70

	2,73 (1H, dd, 14,3 e 11,2)		35,4	34,9	4,03; 2,96	56,8; 130,2; 128,4; 172,2	2,45; 2,96; 4,03; 8,70	4,03
7			128,4	127,9				
8, 12	7.02 (2H, d, 8,5)	7.01 (2H, d, 8.4)	130.2 (2C)	129.7 (2C)		174.5	2.09; 6.6	6.6
9, 11	6.66 (2H, d, 8,5)	6.65 (2H, d, 8.4)	115.5	115.0 (2C)	7.02	128.4; 156.1	115.5; 7.02	7.02
10			156.1	155.8				
13			171.7	171.1				
5-NH	8.70 (2H, t)	8.68 (2H, d)	-	-	4.03	35.4; 56.8; 173.8	2.73; 2.96; 4.03; 8.05	2.73; 2.96; 4.03
10-OH	9.17 (1H, s)	-						
Asn³								
14	4.44 (1H, m)	4.43 (1H, m)	50.16	50.8	2.59; 8.05	36.5; 171.5	2.50; 6.97; 8.05	2.59
15	2.59 (1H, dd, 15.4 e 9.5)	2.58 (1 H, dd, 15.4 e 9.5)	36.5	36.0	4.44	171.5	4.44; 8.05	4.44; 8.05
	2.48 (1H, d,)	2.47 (1H, dd)	36.5	36.0	4.44	50.16; 171.5	8.05	8.05
16			171.5	171.2				
17			171.4	170.0				
14-NH	8.05 (1H, d, 7.2)	8.04 (1H, d)			4.44	36.5; 171.7	51.16; 2.59; 4.03; 6.97; 8.70	2.96; 4.44; 2.59; 4.43
16-NH ₂	7.21 (1H, s)	7.19 (1H, s)			6.87	171.5	2.59; 6.87	6.87

		6.87 (1H, s)	6.85 (1H, s)				171.5	7.21	7.21	
Gln⁴	18	4.51 (1H, m)	4.51 (1H, m)	50.1	49.6	1,74; 2.02; 6.97	27.0	2.09; 6.97	3.76; 1.74; 2.09;	1.74; 2.09;
	19	2.02 (1H, m)	2.03 (1H, m)	27.0	26.5					
		1.74 (1H, m)	1.75 (1H, m)	27.0	26.5	2.09	50.1	2.09; 6.97	4.51; 4.51; 6.97	
	20	2.09 (2H, m)	2.09 (2H, m)	31.0	30.5	31.0	1.74; 4.51; 6.97	6.97		31.0
	21			174.5	174.1					
	22			171.1	170.9					
	18-NH	6.97 (1H, d, 7.8)	6.91 (1H, d)	-	-	4.51	27.0; 50.1;	3.76; 4.03;	1.74; 2.09;	
							171.4	4.51; 8.05	4.51	
	21-NH ₂	7.12 (1H, s)	7.10 (1H, s)	-	-		174.5	2.09; 6.85	6.85	
		6.85 (2H, s)	6.82 (2H, s)				31.0; 174.5	-	7.12	
Prol⁵	23	4.17 (2H, m)	4.16 (2H, m)	61.2	60.8	1.78	25.0; 29.2; 47.6;	1.78; 8.70	1.78; 1.88;	1.98
							173.2			
	24	2,13 (1H,m)/	2.12 (1H, m)	29.5	29.0	1.74; 4.17	61.2	4.17; 8.70	3.76; 4.17	
		1.78 (1H, m)	1.74 (1H, m)	29.5	29.0	2.13; 4.17	61.2; 173.2	3.76; 4.17;	3.76; 4.17	
								8.70		
	25	1.98 (1H,m)/	1.98 (1H, m)	25.0	24.6	3.76	47.6; 61.2		3.76; 4.17	
		1.88 (1H, m)	1.88 (1H, m)	25.0	24.6	3.76	47.6; 61.2	3.76	3.76; 4.17	

	26	3.76 (2H, m)	3.75 (2H, m)	47.6	47.2	1.98	25.0; 29.5	2.02; 4.51	1.78; 1.88; 2.02; 2.09
	27			173.2	172.7				
Asn⁶	28	4.43 (2H, m)	4.42 (2H, m)	51.2	49.7	2.45; 8.70		2,70; 8.70	2.45; 2,70; 8.70
	29	2.70 (1H, d)/ 2.45 (1H, m)	2.71 (1H, dd) 2.45 (1H, dd)	35.6	35.2	2.45; 4.43 2.70; 4.43	172.3 51.2; 172.3	4.43 4.43; 8.70	4.43; 8.70 4.43; 8.70
	30			172.3	171.8	-			
	31			171.7	170.8	-			
	28-NH	8.70 (2H,t)	8.68 (2H,d)	-	-	4.43	35.6; 51.2; 173.2	1.78; 2.13; 2.45; 2.70; 4.43	2.45; 2.70
	30-NH ₂	7.36 (1H, s)/ 6.85 (2H,s)	7.35 (1H,s) 6.82 (2H,s)	-	-	-	172.3 35.6; 172.3	2.45; 2.70; 6.85 7.36	6.85 7.36
Ser⁷	32	4.17 (2H, m)	4.16 (2H, m)	56.6		-	61.8; 170.7	3.66; 7.32	
	33	3.66 (2H, t)	3,66 (2H,d)	61.8		-	56.6; 170.7	4.17; 7.32	
	34			170.7	170.3	-			
	32-NH	7.32 (2H, d)	7.32 (1H, d)	-	-	4.17	56.6; 171.7	3.66; 4.43; 4.86; 8.70	3.66; 4.17; 4.86
	33-OH	4.86 (1H, s)	4.83 (1H, br)	-	-	3.66	56.6; 61.8	3.66; 7.32	3.66; 4.17; 7.32
Graxo	35			171.6	171.2				

36	2.34 (2H, m)	2.33 (2H, m)	42.2	41.7	2.17; 3.99	171.6	1.41; 3.99; 7.14; 7.71	1.41; 3.99; 7.14
37	3.99 (1H,m)	3.97 (1H, m)	45.8	45.4	1.41; 2.34; 7.14		1.41; 2.34; 7.14; 7.71	1.41; 2.34
38	1.41 (2H, m)	1.40 (2H, m)	35.0	34.6	1.25; 3.99		2.34; 3.99; 7.14	
39	1,21 (1H, m)/	1.26 (1H, m)	25.8	25.4		29.0	3.99; 7.14	1.41; 3.99; 7.14
	1,12 (1H, m)	1,16 (1H, m)	25.8	25.4		29.0	3.99	1.41; 3.99; 7.14
40-45	1.24 (br, s)	1.28-1.08	29.0-29.6	28.6- 29.1	0.85	22.5; 29.6	3.99	0.85; 1.41
46	1.24 (br, s)	-	31.7	31.3		22,5		
47	1.27 (br,s)	-	22.5	22.0		14,4; 31,7		
48	0.85 (3H, t)	0.84 (3H, t)	14.4	13.9	1.24	22,5; 31,7		
37-NH	7.14 (1H, d, 8.4)	7.12 (1H, d)			3.99	170.7	1.41; 2.34; 3.66; 3.99; 4.17; 4.43; 7.32	1.41; 3.99; 2.34;

^aExperimento a 500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C em DMSO-*d*₆, com TMS como padrão interno. ^bHIRADATE et al., (2002; H, 600 MHz; ¹³C, 150 MHz; DMSO-*d*₆). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.7.7 Determinação estrutural das demais iturinas por LC-ESI-MS/MS

Amostras Iturina A2, A3, A4 e A5

As amostras Iturina A2, Iturina A3, Iturina A4 e Iturina A5 isoladas do extrato de *B. amyloliquefaciens* LP164 (Item 4.7.7), semelhantemente apresentaram-se como um pó branco amorfo, correspondente a quatro substâncias pura de massa molecular com íons ($[M+H]^+$) em m/z 1057,5661, 1071,5808, 1071,5859 e 1085,5997, coerentes com as fórmulas moleculares $C_{49}H_{76}N_{12}O_{14}$, $C_{50}H_{78}N_{12}O_{14}$, $C_{50}H_{78}N_{12}O_{14}$ e $C_{51}H_{80}N_{12}O_{14}$, respectivamente, de acordo com as análises por LC-ESI-MS/MS de alta resolução.

Os espectros de fragmentação dos íons percussores em m/z 1057, 1071, 1071 e 1085 ($[M+H]^+$) (Figuras 84-87 respectivamente do material em Anexo), no sistema LC-ESI-MS/MS mostraram íons tipo *b* e *y*, onde os íons fragmentos do tipo *y* apresentaram a mesma sequência de aminoácidos já mencionados para a amostra Iturina A1, porém houve variações na série dos íons fragmentos do tipo *b* N-terminal de 14 Da ($-CH_2$). Estes resultados indicaram a natureza homóloga de iturinas A com C_{15} , C_{16} e C_{17} (VATER et al., 2002; DANG et al., 2019). Entretanto, dados de fragmentação observados para o íon precursor de m/z 1071,5808 ($[M+H]^+$) e m/z 1071,5859 ($[M+H]^+$), mostraram íons fragmentos semelhantes não sendo possível serem distinguidos por espectrometria de massas. Para tal foram realizados experimentos de RMN de 1H , 1D e 2D, para determinar a heterogeneidade da cadeia ácido graxo (*normal*, *iso* e *anteiso*), bem como confirmar a sequência peptídica destes lipopeptídeos.

5.7.8 Determinação estrutural das iturinas por RMN

Amostras Iturina A2, A3, A4 e A5

Os espectros de RMN de 1H e HMBC revelaram que as substâncias das amostras Iturina A2, Iturina A3, Iturina A4 e Iturina A5 (Figuras 88-91 respectivamente do material em anexo) são compostas da mesma sequência de aminoácido da amostra Iturina A1, exceto para a estrutura da cadeia β -amino ácido graxo, indicando serem todas classificadas como iturina A, com sequência peptídica βAA - Asn¹-Tyr²-Asn³-Gln⁴- Prol⁵-Asn⁶-Ser⁷. Todas as atribuições de

ressonância 1D e 2D, para as amostras Iturina A2, A3, A4 e A5 estão resumidas nas Tabelas 33-36, respectivamente do material em Anexo.

No espectro de RMN de ^1H da amostra Iturina A2 foi observado uma sobreposição de sinais na região de δ 0,85-0,81 (Figura 59). Observou-se também um duplete em δ 0,85 (6H, d, 6,6 Hz), um tripleto em δ 0,82 (3H, t, 7,0 Hz) e um duplete em δ 0,81 (3H, d, 7,0).

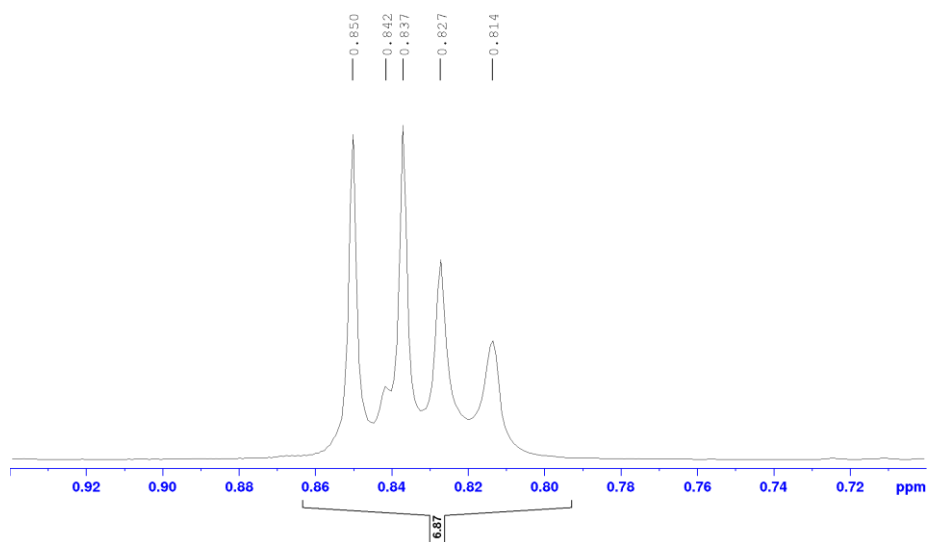


Figura 59. Ampliação do espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) da amostra Iturina A2.

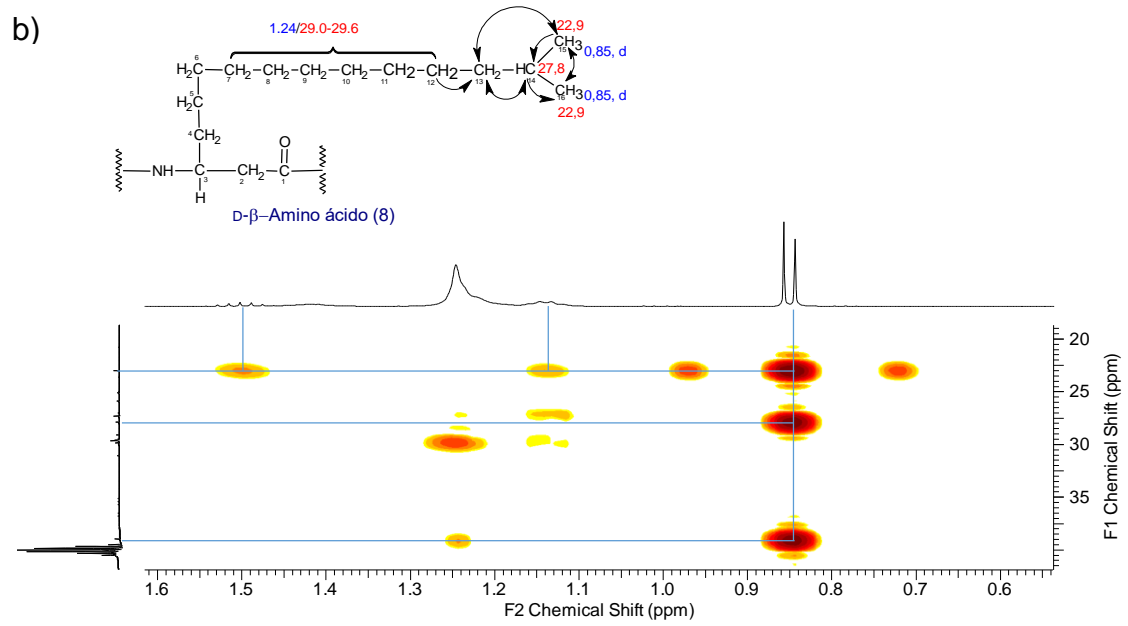
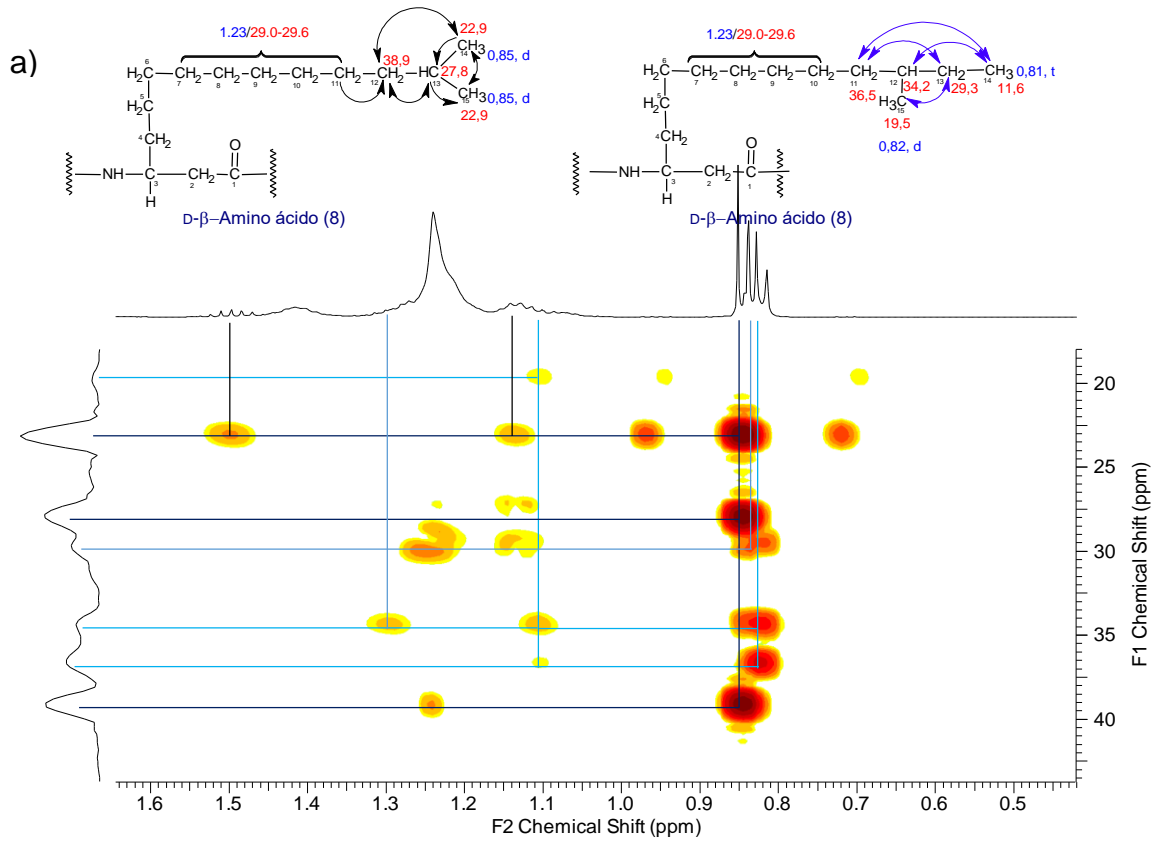
O mapa de correlação HMBC da amostra Iturina A2 (Figura 60a), revelou a presença de uma mistura das isoformas da iturina A (C_{15}) com variações na ramificação da cadeia β -amino ácido graxo através de um grupo terminal isopropil (*iso*) e um outro *sec*-butil (*anteiso*). As correlações do sinal em δ 0,85 (6H, d, 6,6 Hz) (H-14) com os sinais dos carbonos em δ 22,9, δ 27,8 e δ 38,9 (C-15, C-13 e C-12, respectivamente) indicam que a cadeia lateral β -amino ácido graxo para a iturina A (C_{15}) *iso* é $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. As correlações do sinal em δ 0,81 (3H, t, 7,0 Hz) (H-12) com os sinais dos carbonos em δ 34,2 e δ 36,5 (C-12 e C-11, respectivamente) e do sinal em δ 0,82 (3H, d, 7,0) (H-15) com o sinal em δ 29,3 (C-13) indicam que a cadeia lateral β -amino ácido graxo para a iturina A (C_{15}) *anteiso* é $-(\text{CH}_2)_8\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$.

O HMBC da amostra Iturina A3 (Figura 60b) apresentou um grupo terminal isopropil, pelas correlações do duplete em δ 0,85 (6H, d, 6,6 Hz) (H-15 e H-16)

com os sinais dos carbonos em δ 22,9, δ 27,8 e δ 38,9 (C-15, C-14 e C-13, respectivamente), indicando que a cadeia lateral ácido graxo β -amino ácido para a iturina A (C₁₆) *iso* é $-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

Para a Iturina A4 as correlações HMBC (Figura 60c) revelou a presença de uma mistura das isoformas da iturina A (C₁₆) *iso* e *normal* observados pelas correlações do sinal em δ 0,84 com os sinais dos carbonos em δ 22,9, δ 27,8 e δ 38,9 (C-15, C-14 e C-13, respectivamente) indicando que a cadeia lateral β -amino ácido graxo para a iturina A (C₁₆) *iso* é $-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ e correlações do sinal em δ 0,85 com os sinais dos carbonos em δ 22,5 e δ 31,6 (C-15 e C-14, respectivamente) indicando que a cadeia lateral β -amino ácido graxo para a iturina A (C₁₆) *normal* é $-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$.

Para a amostra Iturina A5 as correlações HMBC (Figura 60d) revelou a presença da isoforma da iturina A (C₁₇) *anteiso* observados pelas correlações do sinal em δ 0,8 com os sinais dos carbonos em δ 34,2 e δ 36,5 (C-14 e C-13, respectivamente) e o sinal em δ 0,82 correlacionando com o sinal em δ 29,3, 34,2 (C-15 e C-14 respectivamente) indicando que a cadeia lateral ácido graxo β -amino para a iturina A (C₁₇) *anteiso* é $-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$.



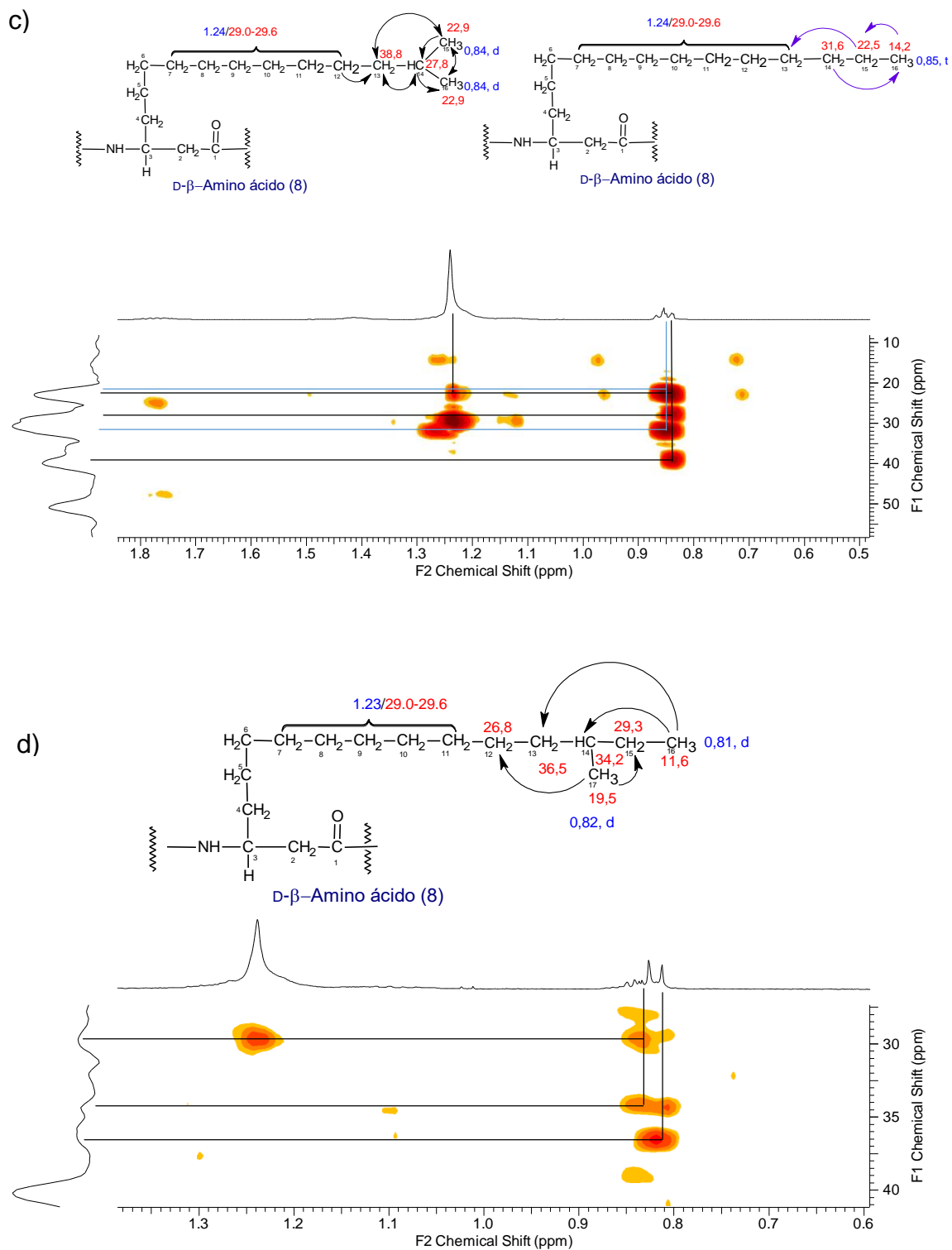


Figura 60. Mapa de correlação de ^1H - ^{13}C HMBC em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz), ampliação das regiões dos grupos das cadeias laterais β -amino ácido graxo: (a) Iturina A2 (b) Iturina A3 (c) Iturina A4 e (d) Iturina A5.

5.7.9 Determinação estrutural dos lipopeptídeos da fengicina por LC-ESI-MS/MS

O perfil LC-ESI-MS/MS do íon precursor de m/z 1463,8 (Figura 61) mostrou uma série de íons fragmentos correspondentes à sequência Pro⁷-Gln⁸-Tyr⁹-Ile¹⁰-Tyr³(ácido graxo β OH-Glu¹-Orn²-)-Thr⁴-Glu⁵-Ala⁶, típica de fengicinas, com abertura do anel preferencialmente na ligação peptídica entre Ala⁶ e Prol⁷, como mostrado pelos fragmentos em m/z 226, 389, 502, 1162, 1263 e 1392. Foram observados também íons em m/z 1209, 1080 e 966 (Figura 62), correspondentes a perdas da cadeia β -OH ácido graxo sozinha, junto com -Glu e junto com -Glu-Orn, respectivamente, do segmento N-terminal da fengicina A (C₁₆) (Figura 61).

De forma semelhante, os íons em m/z 994 e 1108 do íon em m/z 1491,7 (Figura 62) correspondem a perda neutra da cadeia β -OH ácido graxo-Glu e β -OH ácido graxo-Glu-Orn. Porém eles aparecem em m/z 1108 e 994, exatamente. A diferença de 28 Da superior aos íons correspondentes da fengicina A é coerente com a substituição de Ala (71 Da) por Val (99 Da) na posição 6 deste novo homólogo decapeptídeo cíclico, identificado como a fengicina B (C₁₆). Interessantemente, no espectro de CID do íon em m/z 1477,8 foram observados os dois pares de íons fragmentos de m/z 966 e 1080 e m/z 994 e 1108 (Figura 63), indicando que fengicina A (C₁₇) e fengicina B (C₁₅) contribuíram para a formação do íon de m/z 1477,8. Essa associação também foi encontrada em outros trabalhos (BIE, et al., 2009; FARIA et al., 2011) e é atribuída a diferença no comprimento da cadeia ácido graxo, com variações de 14 Da nas séries homólogas das isoformas (A e B). Com isso, o peso molecular das isoformas da fengicina A podem ter o mesmo peso molecular que o de uma isoforma da fengicina B quando a cadeia ácido graxo tiver dois grupos CH₂ a menos, sendo equivalente à diferença de 28 Da entre Val e Ala. Portanto a diferença nos anéis de lactonas das fengicinas A e B pode ser usada como indicador para discriminá-las, visto que em todos os homólogos da fengicina, quando submetidos a análise CID, as fragmentações correspondentes às perdas de β OH ácido graxo-Glu e β OH ácido graxo-Glu-Orn, observadas pelos íons de m/z 966, 1080 na fengicina A e m/z 994, 1108 na fengicina B, indicam a presença de Ala ou Val na cadeia peptídica (Tabela 25), respectivamente.

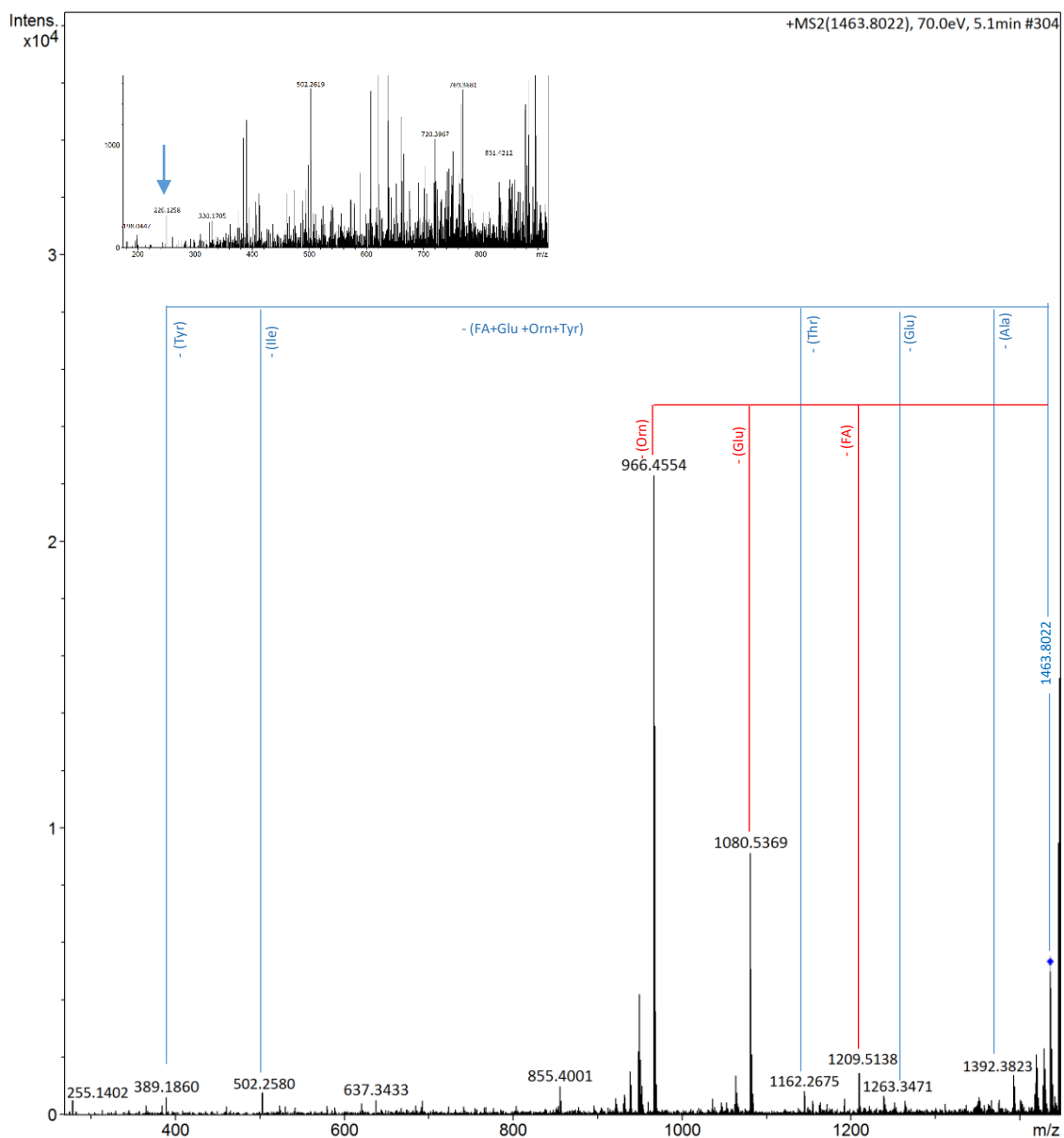
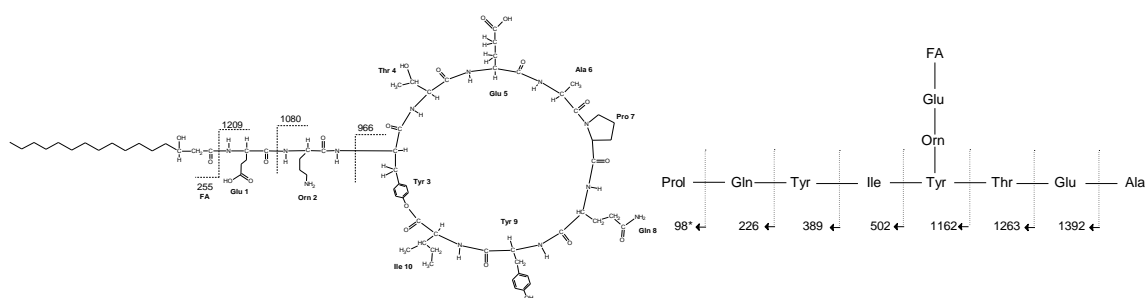


Figura 61. Espectro de fragmentação LC-ESI-MS/MS do íon $[M+H]^+$ em m/z 1463,8022 da amostra Fengicina AB1 e proposta de fragmentação para a isoforma fengicina A (C₁₆).

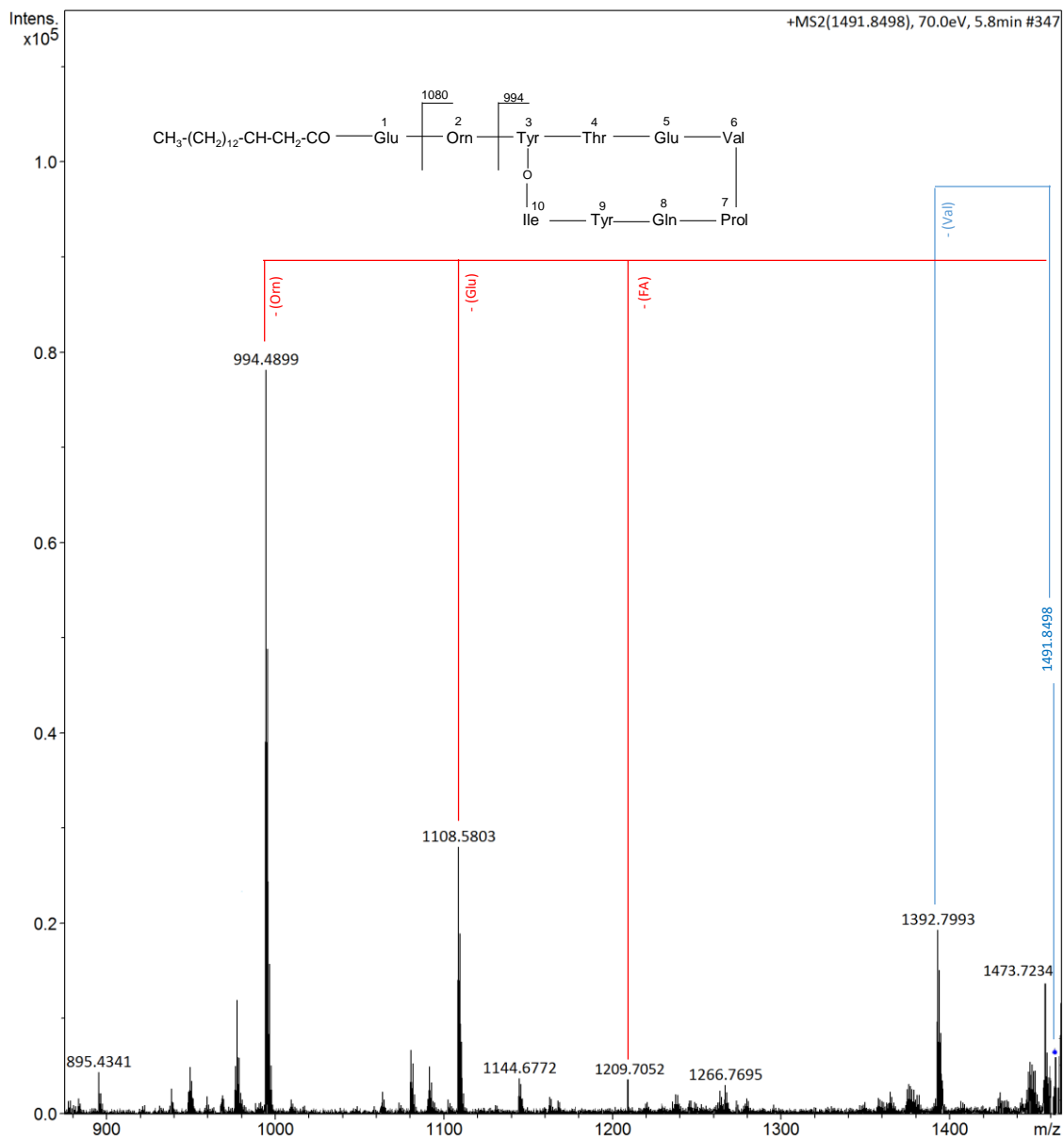


Figura 62. Espectro de fragmentação LC-ESI-MS/MS do íon $[M+H]^+$ em m/z 1491,8498 da amostra Fengicina AB1 e proposta de fragmentação para a isoforma fengicina B (C₁₆).

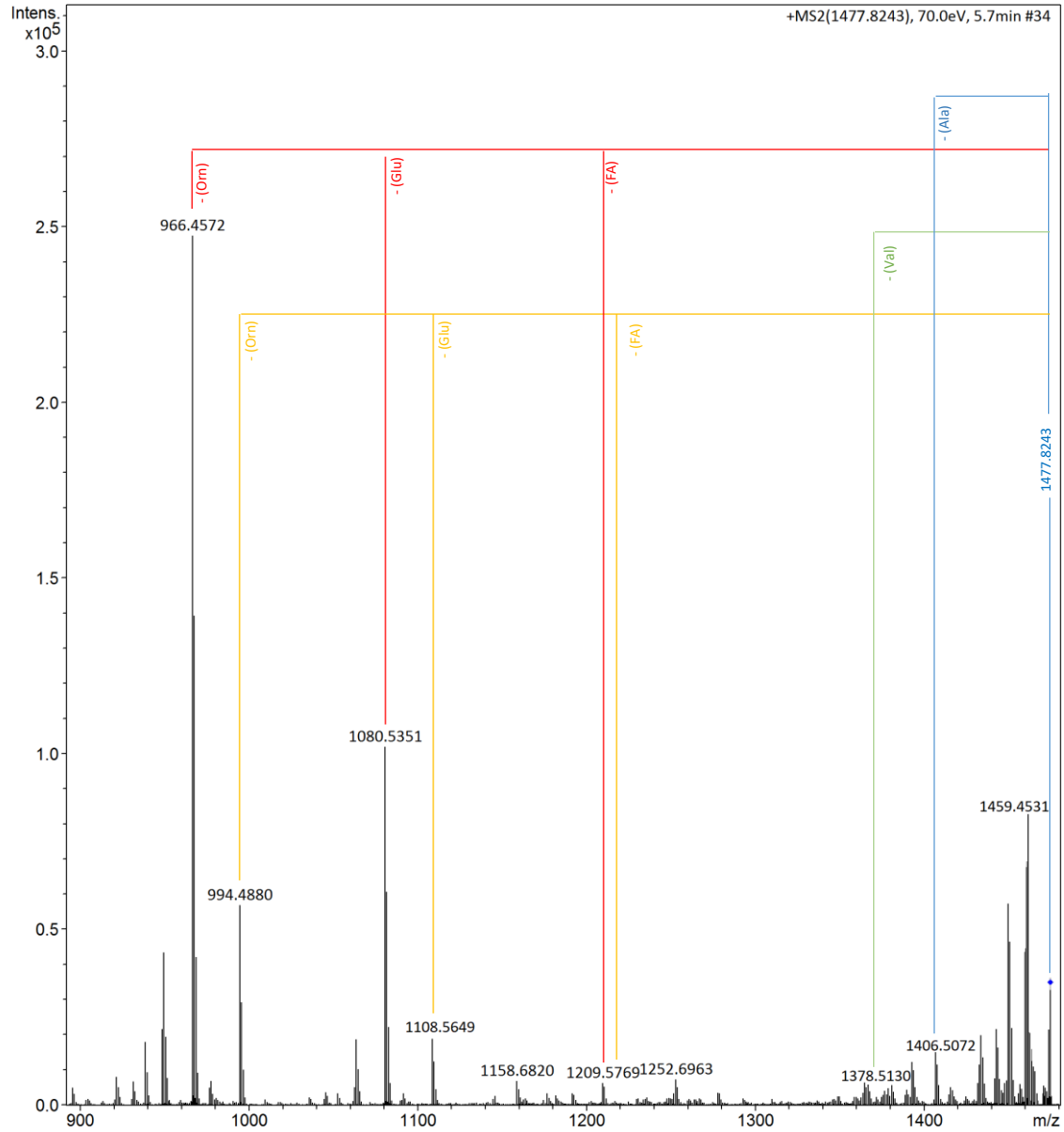
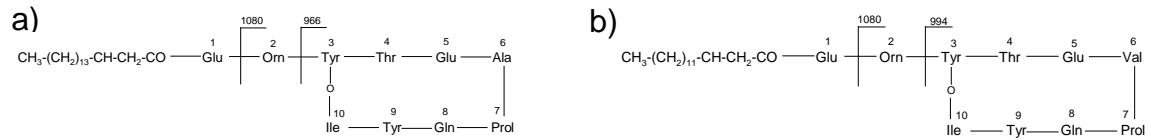


Figura 63. Espectro de fragmentação LC-ESI-MS/MS do íon $[M+H]^+$ em m/z 1477,8243 da amostra Fengicina AB2 e proposta de fragmentação para a isoformas: (a) fengicina A (C_{17}) e (b) fengicina B (C_{15}).

Portanto, esses íons são “marcadores” das fengicinas A e B, respectivamente, e poder servir para identificar rapidamente homólogos da fengicina. As diferenças entre eles e o valor do íon ($[M+H]^+$) permite atribuir o comprimento das cadeias de ácidos graxos. Os resultados acima exemplificam com sucesso a importância do uso da espectrometria de massas na diferenciação dos homólogos da fengicina A e B, mesmo quando duas isoformas de mesmo peso molecular estão presentes, como no caso do íon precursor de m/z 1477,8.

Tabela 25. Atribuição por LC-ESI-MS/MS dos homólogos protonados da fengicina presentes nas amostras Fengicina AB1 e Fengicina AB2 de *B. amyloliquefaciens* (LP164).

Íon (m/z)	Fragmentos	Homólogos da Fengicina A e B	Aminoácido na posição 6
1463,6	1080 e 966	C ₁₆ fengicina A	Ala
1477,8	1080 e 966	C ₁₇ fengicina A	Ala
1477,8	1108 e 994	C ₁₅ fengicina B	Val
1491,7	1108 e 994	C ₁₆ fengicina B	Val

5.7.10 Substâncias lipopeptídicas identificadas de *B. amyloliquefaciens* (LP164)

De acordo com os resultados acima, seis lipopeptídeos da família iturina, sete lipopeptídeos da família surfactina e quatro lipopeptídeos da família da fengicina (Tabela 26) foram isolados de uma cepa endofítica de *B. amyloliquefaciens*, associada a *P. peltatum*. Todos esses lipopeptídeos são conhecidos, por exemplo: os homólogos da iturina A foram isolados de um endófito *B. amyloliquefaciens* (HIRADATE et al., 2002), os homólogos da surfactina A, de *B. subtilis* (LIU et al., 2007), e homólogos da fengicina, de *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* (PECCI et al., 2010; KAKI et al., 2020).

Em geral, as famílias surfactina, iturina e/ou fengicina são mais frequentemente relatadas para *B. subtilis* (FIRA et al., 2018; MEJRI et al., 2017; KHASPAR et al., 2019), em segundo lugar para *B. amyloliquefaciens* (DIMKIĆ

et al., 2017; FIRA et al., 2018; SOARES et al., 2016) e, às vezes, para outras espécies de *Bacillus*. São exemplos de produtores de surfactinas: *B. megaterium* (SUMI et al., 2015), *B. pumilus* (SLIVINSKIET et al., 2012), *B. mojavensis* (AYED et al., 2014), *B. licheniformis* (LIU et al., 2016), *B. natto* (KAMEDA et al., 1974; SUN et al., 2019) e *B. polyfermenticus* (KIM et al., 2009); de fengicinas: *B. thurigiensis* (ROY et al., 2013), *B. mojavensis* (AYED et al., 2014) e *B. megaterium* (PUEYO et al., 2009); e de iturinas: *B. natto* (SUN et al., 2019) e *B. megaterium* (SUMI et al., 2015).

Embora relatos recentes tenham revelado genes de surfactina, fengicina e iturina em outras cepas de *B. amyloliquefaciens* (por exemplo, LV et al. 2020), a produção de diferentes isoformas destes lipopeptídeos variam para cada linhagem. Até o presente momento, poucas cepas de *B. amyloliquefaciens* produzem as três famílias de lipopeptídeos, simultaneamente (FARZAND et al., 2020; CALVO et al., 2019). Porém, este é o primeiro relatório com da produção simultânea de seis iturina A (C₁₄, -C₁₇), sete surfactina A (C₁₃-C₁₆), duas fengicina A (C₁₆ e C₁₇) e duas fengicina B (C₁₅ e C₁₇) por uma cepa de *B. amyloliquefaciens* (Tabela 25). Nossos resultados ratificam que a variedade de isoformas das famílias de lipopeptídeos surfactina, fengicina e iturina têm significado químico para as espécies de *Bacillus*, em particular para *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis*, presumivelmente seus principais produtores.

Tabela 26. Lipopeptídeos identificados de *B. amyloliquefaciens* (LP164) por LC-ESI-MS/MS e RMN.

Lipopeptídeos	Fórmula Molecular	Calculada [M+H] ⁺	Observada [M+H] ⁺	Erro (ppm)
Surfactina A (<i>i</i> -C ₁₃)	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6654	5.75
Surfactina A (<i>a</i> -C ₁₃)	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6654	5.75
Surfactina A (<i>n</i> -C ₁₄)	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6755	0.19
Surfactina A (<i>i</i> -C ₁₄)	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6748	0.48
Surfactina A (<i>a</i> -C ₁₅)	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.69096	1036.6967	5.59
Surfactina A (<i>i</i> -C ₁₅)	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.69096	1036.6967	5.59
Surfactina A (C ₁₅)	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1050.70661	1050.7049	1.61
Iturina A (<i>n</i> -C ₁₄)	C ₄₈ H ₇₄ N ₁₂ O ₁₄	1043.55257	1043.5545	1.91

Iturina A (<i>i</i>-C₁₅)	C ₄₉ H ₇₆ N ₁₂ O ₁₄	1057.56822	1057.5661	1.98
Iturina A (<i>a</i>-C₁₅)	C ₄₉ H ₇₆ N ₁₂ O ₁₄	1057.56822	1057.5661	1.98
Iturina A (<i>n</i>-C₁₆)	C ₅₀ H ₇₈ N ₁₂ O ₁₄	1071.58387	1071.5808	2.79
Iturina A (<i>i</i>-C₁₆)	C ₅₀ H ₇₈ N ₁₂ O ₁₄	1071.58387	1071.5859	1.95
Iturina A (<i>a</i>-C₁₇)	C ₅₁ H ₈₀ N ₁₂ O ₁₄	1085.59952	1085.5997	0.18
Fengicina A (C₁₅)	C ₇₂ H ₁₁₀ N ₁₂ O ₂₀	1463.80376	1463.8022	1.02
Fengicina A (C₁₇)	C ₇₄ H ₁₁₄ N ₁₂ O ₂₀	1491.83506	1491.8398	3.21
Fengicina B (C₁₅)	C ₇₃ H ₁₁₂ N ₁₂ O ₂₀	1477.81941	1477.8243	3.31
Fengicina B (C₁₆)	C ₇₃ H ₁₁₂ N ₁₂ O ₂₀	1477.81941	1477.8243	3.31

a-anteiso; i-iso; n-normal

5.8 Ensaios Biológicos

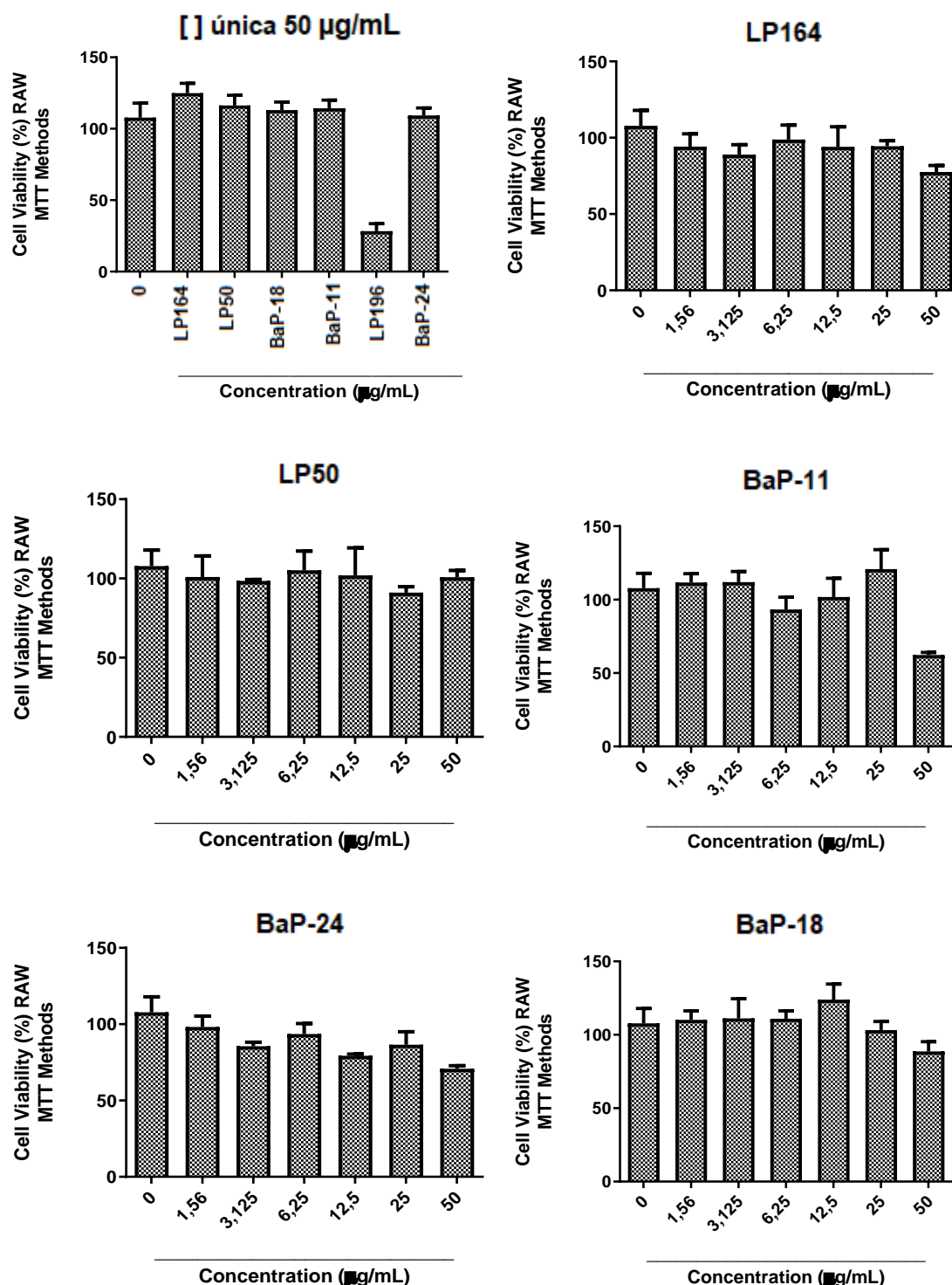
5.8.1 Atividade anti-inflamatória *in vitro*

Os extratos LP 50, LP 164, LP 196 e as frações BaP-24, BaP-11 e BaP-18 foram testadas quanto a atividade anti-inflamatória *in vitro*. Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

5.8.1.1 Efeitos dos lipopeptídeos na viabilidade celular

Inicialmente, os extratos LP 50, LP 164, LP 196 e as frações BaP-24, BaP-11 e BaP-18 foram inicialmente avaliados em uma concentração única de 50 µg/mL, para avaliação prévia do comportamento das amostras frente a células de macrófagos murinos J774A.1 (Item 4.8.1). Em seguida as amostras submetidas ao teste de viabilidade celular utilizando seis diferentes concentrações. A Figura 64 mostra as curvas de dose-resposta obtidas para a linha celular testada. Controles positivos contendo meio de cultura (sem lipopeptídeos) foram incluídos e correspondem a 100% de viabilidade celular. Os resultados obtidos mostram viabilidade celular acima de 100% para os lipopeptídeos avaliados, exceto para a amostra LP 196 na concentração única de 50 µg/mL. Observou-se que os extrato LP 50, LP 164 e as frações BaP-24 e BaP-18 não apresentaram potencial para citotoxicidade à cepa testada nas concentrações 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 µg/mL, indicando que essas concentrações são seguras para testes posteriores. Os resultados são semelhantes para a BaP-11 em concentrações mais baixas, enquanto na

concentração de 50 µg/mL houve uma redução de aproximadamente 50%, demonstrando que nessa concentração há um efeito citotóxico. Assim, fica claro que as iturinas apresentam atividade citotóxica à cepa testada em concentrações



As células foram incubadas com as frações/extratos por 24 h. Os valores correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes, em triplicatas. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltipla Tukey.

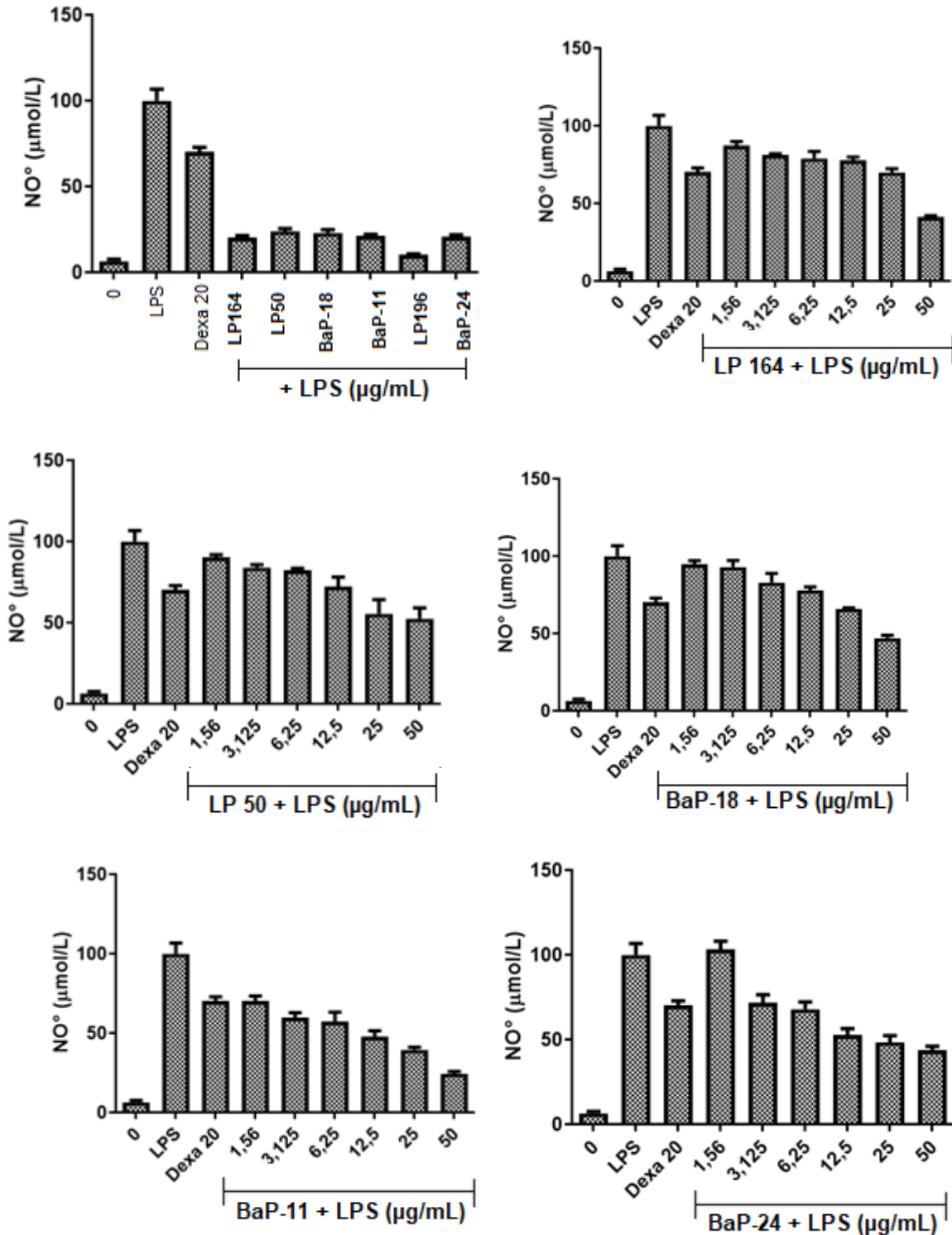
Figura 64. Teste de viabilidade celular (MTT) - Efeito dos extratos e frações lipopeptídicas de *B. amyloliquifaciens* sobre a viabilidade de macrófagos de murinos J774A.1.

mais elevadas. Este efeito citotóxico também foi observado para o extrato LP 196 na concentração única de 50 µg/mL o qual apresentou viabilidade celular abaixo de 50 % (Figura 64).

5.8.1.2 Efeitos dos lipopeptídeos na produção de Óxido Nítrico

Em seguida as amostras de lipopeptídeos foram avaliadas quanto à capacidade de inibição da produção de Óxido Nítrico (NO) na cepa J774A.1 de macrófagos murinos, ativada com 1 µg/mL de LPS. Os extratos LP50, LP164, BaP-24, BaP-11 e BaP-18 foram testados em seis concentrações e o LPS foi usado como controle positivo e o medicamento padrão Dexametasona foi usado como controle negativo.

A Figura 65 revelou que a produção de NO foi quase indetectável em células sem estimulação por LPS. Enquanto o LPS (1 µg / mL) sozinho induziu marcadamente a produção de NO comparado ao grupo controle. Os resultados obtidos para os extratos LP50, LP164 e frações de surfactina, iturina e fengicina mostraram uma redução significativa na capacidade de produção de NO em macrófagos induzidos por LPS, observados em uma concentração única de 50 µg/mL ($p < 0,05$ e $p < 0,001$) quando comparados ao controle LPS e o padrão de Dexametasona. Para a amostra BaP-24 (surfactinas), observou inibição de NO nas concentrações de 12,25 e 50 µg/mL enquanto que a amostra de BaP-11 (iturinas) apresentou redução na produção de NO nas concentrações de 3,1, 6,2, 12 e 25 ($p < 0,05$ e $p < 0,001$) µg/mL quando comparados ao controle LPS e o padrão Dexametasona (Figura 65). Portanto, verificou-se que dentre as amostras testadas, LP164 ($124,8935 \pm 11,97069$), LP50 ($116,2620 \pm 12,4997$), BaP-11 ($114,2537 \pm 10,01212$), BaP-24 ($109,3020 \pm 9,026206$) e BaP-18 ($113,0193 \pm 9,84881$) foram viáveis, apresentando atividade anti-inflamatória superior a 90%. Os valores, quando comparado ao grupo controle negativo indicaram confiabilidade de 95%.



A quantificação de nitrito foi mensurada em sobrenadantes de macrófagos murinos J774A.1, após estimulado com 1 µg/mL de LPS utilizando reagente de Griess. Cada valor é a média ± E.P.M. de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando o teste de comparações múltiplas Tukey – $p < 0,05$, quando comparado ao controle (com LPS).

Figura 65. Teste de determinação de nitritos- Efeito dos extratos e frações lipopeptídicas de *B. amyloliquefaciens* na produção de NO em macrófagos murino J774A.1 estimulados com LPS.

A atividade anti-inflamatória da surfactina isolada de *Bacillus subtilis* já está bem estabelecida na literatura (KIM et al., 2006; ZHAO et al., 2017; YANG et al., 2019). Há relatos de que a surfactina inibe a produção de NO induzida por LPS e diminui a expressão de iNOS, ciclooxygenase-2 (COX-2) e IL-1 β , além da inibição do NF- κ B induzido pelo ácido lipoteicóico (LTA) (KIM et al., 2006; ZHANG et al., 2015; ZHAO et al., 2017) confirmando os dados obtidos neste trabalho. No entanto, apesar dos lipopeptídeos de iturina e fengicina serem considerados excelentes antifúngicos (XUN-CHAO et al., 2013; GU et al., 2017; ZHAO et al., 2017), ainda não são relatados como agentes anti-inflamatórios, demonstrando a importância deste trabalho.

Estudos demonstraram que a associação de bactérias endofíticas com plantas medicinais gera uma grande oportunidade para a produção de substâncias bioativas (AFZAL et al., 2019; PANDEY et al., 2017). Assim, a produção das três famílias de lipopeptídeos pela bactéria endofítica *B. amyloliquefaciens* pode contribuir com as propriedades anti-inflamatórias atribuídas a *P. peltatum* (Piperaceae), uma possibilidade a ser investigada.

5.8.2 Ensaio Antimicrobianos

Como não existe um padrão sobre o nível aceitável para determinar a eficácia de extratos utilizou-se como critério para a determinação da atividade antimicrobiana a presença de halo de inibição igual ou superior a 5 milímetros (AL-HEBSHI et al., 2006; OSTROSKY et al., 2008) (Tabela 27).

Tabela 27. Critério de avaliação da atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar.

Diâmetro (mm)	Resultado
Acima 20	Boa atividade
Entre 15 a 20 mm	Moderada atividade
Entre 5 a 15 mm	Pouca atividade
Ausência do halo	Inativo

Os resultados da atividade antibacteriana para os extratos LP50, LP164, LP196 e frações BaP-11, BaP-18 e BaP-24 estão apresentados na Tabela 26. Observou-se que apenas as amostras LP164 e LP196 apresentaram pouca

atividade na concentração testada 5mg/mL no teste de difusão em ágar frente a bactéria *K. pneumoniae* (Figura 66 e Tabela 28).

Tabela 28. Resultados das amostras LP50, LP164, LP196, BaP-11, BaP-18 e BaP-24, testadas frente as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

	Extratos/Frações LPs						Controle
	LP50	LP164	LP196	BaP-11	BaP-18	BaP-24	
<i>E. coli (Butantã)</i>	-	-	-	-	-	-	62,66±2,30
<i>K. pneumoniae</i>	-	10,66mm	10mm	-	-	-	27,66±0,57
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	35,33±0,57
<i>P. putida (oralis)</i>	-	-	-	-	-	-	29,33±1,15
<i>S. entérica Choleraesuis</i>	-	-	-	-	-	-	35,33±0,57
<i>B. subtilis (CT)</i>	-	-	-	-	-	-	45,66±1,15
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	30,66±0,57
<i>S. mutans</i>	-	-	-	-	-	-	33,66±0,57
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	47,66±1,15
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	44,33±0,57

De acordo com os resultados obtidos, a amostra LP164 apresentou MIC de 62, 5 µg/mL frente a bactéria *K. pneumoniae* (Tabela 29). No entanto a amostra LP196 não apresentou atividade nesse teste, demonstrando uma pequena atividade no teste de difusão em ágar (teste anterior), porém em concentrações menores a amostra perde sua ação.

Estes resultados sugerem que os lipopeptídeos surfactina, iturina e fengicina, quando sozinhos são inativos ou que a antibiose do extrato foi causada por outras substâncias que se perderam no procedimento. No caso da primeira hipótese, teríamos que a presença das misturas das três famílias destes lipopeptídeos na amostra do extrato LP164 favoreceu na atividade antibacteriana contra *K. pneumoniae*, ocorrendo um possível efeito sinérgico entre estas moléculas.

Este efeito também foi observado em outros trabalhos onde observaram que a surfactina sozinha não inibe o crescimento de agentes fitopatogênicos, mas possivelmente aumenta significativamente a atividade antifúngica do lipopeptídeo iturina A através de uma relação sinérgica (MAGET-DANA et al., 1992; COUTTE et al., 2010), provavelmente devido à atividade citolítica da

surfactina, ligada à sua potente propriedade surfactante, que enfraquece a membrana celular e facilita o ataque da iturina A (MAGET-DANA et al., 1992).

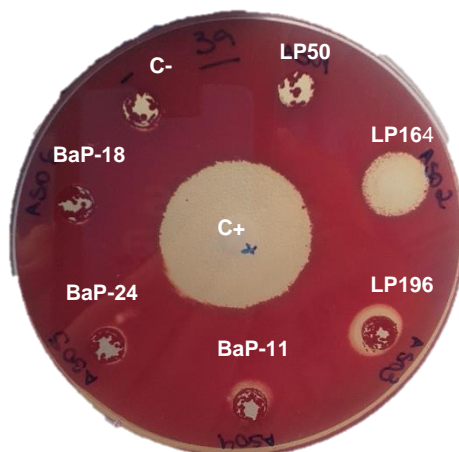


Figura 66. Resultado do teste de difusão em ágar para as amostras lipopeptídicas LP50, LP164, LP196, BaP-11, BaP-18 e BaP-24.

Tabela 29. Concentração Mínima Inibitória (CMI) das amostras LP164 e LP196 testadas frente a *K.pneumoniae*, na concentração inicial de 1000 a 3,90 µg/mL.

Tipo	Amostras	<i>K. pneumoniae</i>
Extrato	LP164	62,5 µg/mL
	LP196	0
	TIENAM	7.81 µg/mL

5.8.3 Teste de atividade antiplasmódica

Os resultados dos testes *in vitro* com extratos e substâncias lipopeptídicas contra *Plasmodium falciparum* FCR3 são apresentados na Figura 67 e Tabela 30. A Figura 67 apresenta o gráfico da curva ajustado para LP50, LP164, LP196, Iturina A2, Surfactina A2 e Fengicina AB1. Verifica-se nas curvas de parasitemia que a atividade antiplasmódica foi mais relevante para a maior concentração testada (50µg/mL⁻¹), e que a intensidade de fluorescência de Fengicina AB1 foi inferior as demais amostras em todas as concentrações testadas.

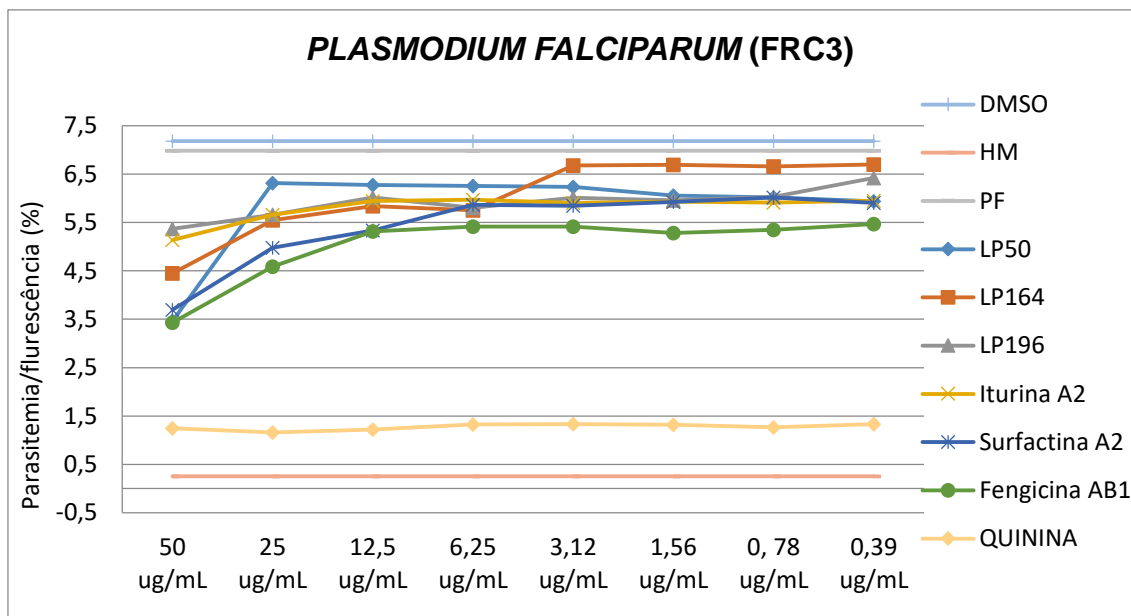


Figura 67. Curvas de dose-resposta normalizadas das diferentes condições testadas no ensaio de atividade antiplasmodial *in vitro* baseado em fluorescência com uso do quinina como droga controle.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 30, o extrato LP196, Fengicina AB1 e Iturina A2 apresentaram baixa atividade antiplasmodica quando comparado ao controle quinina, exibindo CI_{50} de $58,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $58,52 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $66,83 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Enquanto que LP50, LP164 e Surfactina A2 não apresentaram atividade significativas com valores de $CI_{50} >100$. Esses resultados sugerem que os lipopeptídeos de fengicina e iturina bloqueiam levemente o sitio ativo do *Plasmodium* à medida que se eleva a concentração acarretando no aumento da atividade.

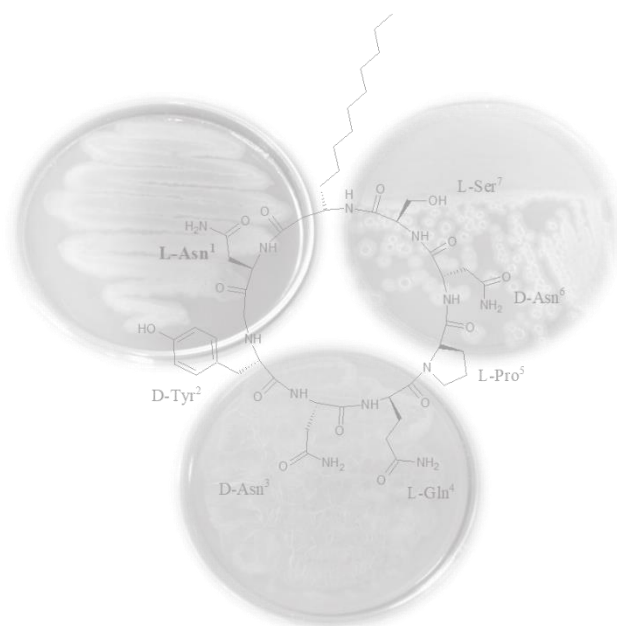
Tabela 30. Atividade antiplasmodica dos extratos e substâncias lipopeptídicas de acordo com p-valor.

Extrato/Substância	$CI_{50}^a \mu\text{g. mL}^{-1}$
LP50	>100
LP164	>100
LP196	58,52
Iturina A2	66,83
Surfactina A2	>100
Fengicina AB1	58,0
Quinina ^b	0,529

^a CI_{50} %: Concentração inibitória 50%; ^bDroga controle: Quinina.

Até o presente momento poucos estudos de lipopeptídeos com atividade antiplasmódica tem sido relatado. Estudos realizados por Torres-Mendonza e colaboradores (2018) apontaram que os lipopeptídeos das pumilacidina A e B isolado de *Bacillus licheniformis* BC98 inibiu o regulador PfSir2 do *Plasmodium falciparum*, e o crescimento do mesmo por disfunção mitocondrial e diminuição do Ca²⁺ citosólico. No entanto, pouco ainda se sabe da possível ação dos lipopeptídeos nos parasitas do *Plasmodium falciparum*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS



Neste trabalho foram identificadas 17 substâncias lipopeptídicas produzidas pela linhagem de bactéria endofítica *B. amyloliquefaciens* LP164, uma variedade poucas vezes observada de lipopeptídeos produzidos por uma única cepa. O acerto das condições de purificação dessas substâncias foi significativo, tanto para suas determinações inequívocas quanto para os ensaios biológicos realizados.

A otimização da produção dos lipopeptídeos das linhagens endofíticas valoriza ainda mais a variedade dessas substâncias, pois lhes permite obter em quantidades mais significativas, a partir de YM, um meio relativamente barato. O pH, agitação e aeração foram revelados como os fatores mais determinantes um rendimento do extrato de lipopeptídeos até 13 vezes maior que os descritos na literatura para *B. amyloliquefaciens*.

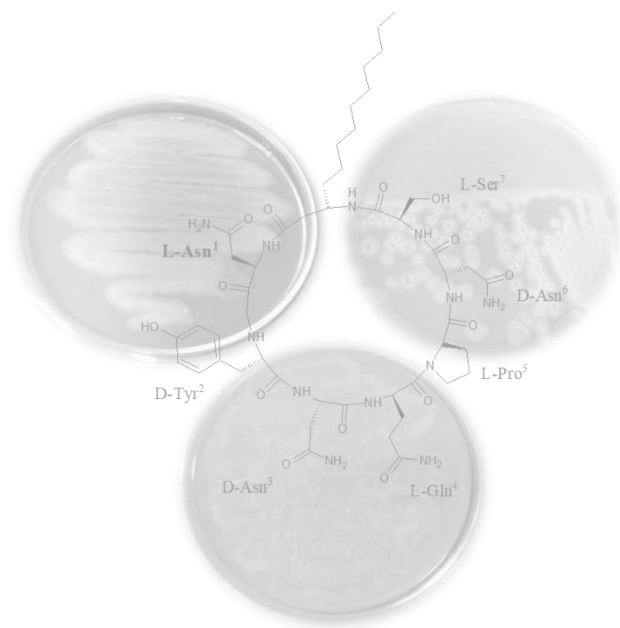
Estudos sistemáticos sobre a economia da produção de lipopeptídeos são escassos na literatura, porém os resultados obtidos neste trabalho indicam ser esta uma abordagem relevante para uma maior produção de lipopeptídeos com menor custo, principalmente se considerarmos as inúmeras aplicações atribuídas a eles.

Entre as atividades biológicas observadas neste trabalho, destacamos o extrato da linhagem *B. amyloliquefaciens* LP164 com MIC de 62,5 µg/mL contra a bactéria *K. pneumoniae*, um alvo de evidência importante para a saúde pública.

Destacamos também as amostras de iturina e fengicina que apresentaram atividade antimalárica inédita, ainda que fraca, contra *P. falcipurum* porém significativas e também inéditas atividades anti-inflamatórias, no ensaio de inibição da produção de NO em células de macrófagos murinos J774A.1.

A combinação dos resultados de purificação e otimização da produção possibilitarão estudos futuros de aplicação dos lipopeptídeos de *B. amyloliquefaciens*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A. H. Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5 A. Appl. Biochem. Biotechnol. v. 150, p. 305–325, 2008.

ABDELLI, F.; JARDAK, M.; ELLOUMI, J.; STIEN, D.; CHERIF, S.; MNIF, S.; AIFA, S. Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin(s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4. Biodegradation, 2019.

ABDERRAHMANI, A., TAPI, A., NATECHE, F., CHOLLET, M.; LECIERE, V.; WATHELET, B. HACENE, H.; JACQUES, P. Bioinformatics and molecular approaches to detect NRPS genes involved in the biosynthesis of kurstakin from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 92, p. 571–581, 2011.

ABRIOUEL, H.; FRANZ, C. M. A. P.; OMAR, N. B.; GÁLVEZ, A. Diversity and application of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiol. Rev. v. 35, p. 201-232, 2011.

ADAMCZAK M. AND BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. Biotechnol. Lett. v. 22, p. 313-316, 2000.

AKPA, E.; JACQUES, P.; WATHELET, B.; PAQUOT, M.; FUCHS, R.; BUDZIKIEWICZ, H.; THONART, P. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. Appl. Biochem. Biotechnol. v. 91, p. 551-561, 2001.

AL-AJLANI, M. M.; SHEIKH, M. A.; AHMAD, Z.; HASNAIN, S. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. Microb. Cell Fact. v. 6, p. 6-17, 2007.

ALETI, G.; SESSITSCH, A.; BRADER, G. Genome mining: prediction of lipopeptides and polyketides from *Bacillus* and related Firmicutes. Comput Struct Biotechnol. J. v. 13, p. 192–203, 2015.

AL-HEBSHI, N.; AL-HARONI, M.; SKAUG, N. *In vitro* antimicrobial and resistance-modifying activities of aqueous crude khat extracts against oral microorganisms. Arch. Oral Biol. v. 51, p. 183-188, 2006.

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. J. Appl. Microbiol. v. 112, p. 159-174, 2012.

ALVIN, A.; MILLER, K. I.; NEILAN, B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. Microbiol. Res. v. 169, n. 7-8, p. 483-495, 2014.

AFZAL, B. I.; SHINWARIA, Z. K.; SIKANDARB, S.; SHAHZADC, S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiol. Research.* v. 221, p. 36–49, 2019.

AGARWAL, M.; DHEEMAN, S.; DUBEY, R.C.; KUMAR, P.; MAHESHWARI, D.K.; BAJPAI, V.K. Differential antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. *Microbiol. Res.* v. 205, p. 40-47, 2017.

ARGUELLES ARIAS A.; ONGENA, M.; DEVREESE, B.; TERRAK, M.; JORIS, B.; FICKERS, P. Characterization of amylolysin, a novel lantibiotic from *Bacillus amyloliquefaciens* GA1. *PLoS One*, v. 8, p. 83037, 2013.

ARREBOLA, E.; JACOBS, R.; KORSTEN, L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *J. Appl. Microbiol.* v. 108, p. 386-395, 2010.

ARGUELLES-ARIAS A.; ONGENA, M.; HALIMI, B.; LARA, Y. BRANS, A.; JORIS, B.; FICKERS, P. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb. Cell Fact.* v. 8, p. 63, 2009.

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

AWAIS, M.; SHAH, A. A, HAMEED, A.; HASAN, F. Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *Bacillus sp.* *Pak J Bot.* v. 39, p. 1303, 2007.

AYED, H. B.; HMIDET, N.; BÉCHET, M.; CHOLLET, M.; CHTAIGNÉ, G.; LECLÈRE, V.; JCQUES, P.; NASRI, M. Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21. *Process Biochem.* v. 49, p. 1699-1707, 2014.

AYED, H. B.; HMIDET, N.; BECHET, M.; JACQUES, P.; NASRI, M. Identification and natural functions of cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *Eng. Life Sci.* v. 17, p. 536–544, 2017.

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*.1°. Jaguariúna: EMBRAPA – Meio Ambiente, p. 57-59, 2000.

AZEVEDO, J. L.; MACHERONI Jr, W. PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic J. of Biotechn.* v. 3, p. 40-65, 2000.

AZUMI, M.; OGAWA, K-I.; FUJITA, T.; TAKESHITA, M.; YOSHIDA, R.; FURUMAI, T.; IGARASHI, Y. Bacilosarcins A and B, novel bioactive isocoumarins with unusual heterocyclic cores from the marine-derived bacterium *Bacillus subtilis*. *Tetrahedron*. v. 64, p. 6420-6425, 2008.

BACON, C. W.; HINTON, D. M.; MITCHELL, T. R.; SNOOK, M. E.; OLUBAJO, B. Characterization of endophytic strains of *Bacillus mojavensis* and their production of surfactin isomers. *Biological Control*. v. 62, p. 1-9, 2012.

BAGAVAN, A.; RAHUMAN, A. A.; KAUSHIK, N. K.; SAHAL, D. In vitro antimalarial activity of medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* v. 108, p. 15-22, 2011.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 53, p. 495–508, 2000.

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, p. 409-414, 2007.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, p. 201-296, 2002.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: Editora UNICAMP, 1996.

BARROS NETO, BENÍCIO; SCARMINIO, IEDA S.; BRUNS, ROY E. Como fazer experimentos. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, p. 414, 2010.

BARTAL, A.; VIGNESHWARI, A; BOKA, B.; VOROS, M.; TAKAES, I.; KREDICS, L.; MANEZINGER, L.; VARGA, M.; VAGVOLGYI, C.; SZEKERES, A. Effects of Different Cultivation Parameters on the Production of Surfactin Variants by a *Bacillus subtilis* Strain. *Molecules*, v. 23, p. 2-14, 2018.

BECHET, M.; CARADEC, T.; HUSSEIN, W.; ABDERRAHMANI. A.; CHOLLET, M.; LECLERE, V.; DUBOIS, T.; LERECLUS, D.; PUPIN, M.; JACQUES, P. Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus spp.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 95, p. 593–600, 2012.

BEZERRA, M. S. Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIIA utilizando manipueira como fonte de carbono. Tese de doutorado, Natal, 2012.

BEZERRA, M. S.; HOLANDA, V. C. D.; AMORIM, J. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Produção de biotensioativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (P.A.) e Resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. *Holos*, 2012.

BHORE, S. J.; NITHYA, R.; LOH, C. Y. Screening of endophytic bacteria isolated from leaves of SambungNyawa [*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.] for cytokinin-like compounds. *Bioinformation*. v. 5, p. 191-197, 2010.

BIE, XM.; LU, ZX.; LU, FX . Identification of fengycin homologues from *Bacillus subtilis* with ESI-MS/ CID. *J. Microbiol. Methods*. v. 79, p. 272–278, 2009.

BINIARZ, P.; LUKASZEWICZ, M. Direct quantification of lipopeptide biosurfactants in biological samples via HPLC and UPLC-MS requires sample modification with an organic solvent. *Methods and Protocols*. v. 101, p. 4747-4759, 2017.

BONMATIN, JM., LAPREVOTE, O., PEYPOUX, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity structure relationships to design new bioactive agents. *Comb Chem High Throughput Screen*. 6: 541-556, 2003.

BOYLE, J. G.; WHITEHOUSE, C. M.; FENN, J. B. An ion-storage time-offlight mass spectrometer for analysis of electrospray ions. *Rapid Comm. in Mass Spectr.* v. 9, p. 400, 1991.

BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F. SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. *C. Opinion in Biotechnol.* v. 27, p. 30-37, 2014.

BRUNER, S. D.; WEBER, T.; KOHLI, R. M.; SCHWARZER, D.; MARAHIEL, M. A.; WALSH, C. T.; STUBBS, M. Structural Basis for the Cyclization of the Lipopeptide Antibiotic Surfactin by the Thioesterase Domain SrfTE. *Structure* vol. 10, p. 301–310, 2002.

BUTCHER, R. A.; SCHROEDER, F. C.; FISCHBACH, M. A.; STRAIGHT, P. D.; KOLTER, R.; WALSH, C.T.; CLARDY, J. The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 104, p. 1506–1509, 2007.

CALVO, H.; MEDIARA, I.; ARIAS, E.; BLANCO, D.; VENTURINI, M. E. The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. *Food Microbiol.* v. 82, 62-69, 2019.

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

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

CHAABONI, I.; GUESMI, A.; CHERIF, A. Secondary metabolites of *Bacillus*: potentials in biotechnology. In: Sansinenea E (Ed.) *Bacillus thuringiensis* biotechnology. Springer, p. 347-366, 2012.

CHANDRAKAR, S. AND GUPTA, A. K. Actinomycin-producing endophytic *Streptomyces parvulus* associated with root of aloe vera and optimization of conditions for antibiotic production. *Probiotics Antimicrob. P.* v. 11, p. 1055–1069, 2018.

CHEBOTAR, V. K., MALFANOVA, N. V., SHCHERBAKOV, A. V., AHTEMOVA, G. A., BORISOV, A. Y., LUGTENBERG, B. AND TIKHONOVICH, I. A. Endophytic bacteria in microbial preparations that improve plant development (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* v. 51, p. 271-277, 2015.

CHEN, X. H.; KOUMOUTSI, A. SCHOLZ, R.; BORRIS, R. More than anticipated - production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* v. 16, p. 14-24, 2009.

CHEN, X. H.; SCHOLZ, R.; BORRISS, M.; JUNGE, H.; MOGEL, G.; KUNZ, S.; BORRISS, R. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J. Biotechnol.* v. 140, p. 38–44, 2009.

CHEN, L.; WANG, N.; WANG, X.; HU, J.; WANG, S. Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. *Biores. Technology.* v. 101, p. 8822-8827, 2010.

CHOWDHURY, S. P.; DIETEL, K.; RANDLER, M.; SCHMID, M.; JUNGE, H.; BORRISS, R.; HARTMANN, A.; GROSCHE, R. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on Lettuce Growth and Health under Pathogen Pressure and Its Impact on the Rhizosphere Bacterial Community. *PLoS ONE.* v. 8, p. 68818, 2013.

CHOWDHURY, S. P.; HARTMANN, A.; GAO, X.; BORRISS, R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. *Front. Microbiol.* v. 6, p. 780, 2015.

CLAUS, D.; BERKELEY, R. C.W. Genus *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematic/ Bacteriology*. Volume 2. Eds. Sneath, P.H.A. Williams and Wilkins. USA. p. 1105-1139, 1986.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility. Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. Approved Standard – Ninth edition. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2012.

COHN, F. Untersuchungen Über Bakterien. *Beitr Biol Pflanz.* v. 1, p. 127-224, 1872.

COCHRANE, S. A.; LOHANS, C. T.; VAN BELKUM, M. J.; BELS, M. A.; VEDERAS, J. C. Studies on tridecaptin B(1), a lipopeptide with activity against multidrug resistant Gram-negative bacteria. *Org. Biomol. Chem.* v. 13, p. 6073–6081, 2015a.

COCHRANE, S. A.; SURGENOR, R. R.; KHEY, K. M.; VEDERAS, J. C. Total synthesis and stereochemical assignment of the antimicrobial lipopeptide cerexin A1. *Org. Lett.* v. 17, p. 5428–5431, 2015b.

COCHRANE, S. A.; VEDERAS, J. C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Med. Research Rev.* v. 36, p. 4–31, 2016.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 71, p. 4951-4959, 2005.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growthpromoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plant: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biotechn.* v. 42, p. 669-678, 2010.

COUTTE, F.; LECLÈRE, V.; BÉCHET, M.; GUEZ, J. S.; LECOUTURIER, D.; CHOLLETIMBERT, M.; DHULSTER, P.; JACQUES, P. Effect of pps disruption and constitutive expression of *srfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. *J. of Appl. Microbiol.* v. 109, p. 480-491, 2010.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. and Environ. Microbiol.* v. 42, p. 408-410 , 1981.

COSTA, G. A. N. Produção biotecnológica de surfactant de *Bacillus subtilis* em resíduos agroindustrial, caracterização e aplicações. Dissertação de mestrado Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2005.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEM, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J. of Appl. Microbiol.* v. 104, p. 1675–1684, 2008.

DANDERS, W.; MARAHIEL, M.A.; KRAUSE, M.; KOSUI, N.; KATO, T.; IZUMIYA, N.; KLEINKAUF, H. Antibacterial action of gramicidin S and tyrocidines in relation to active transport, in vitro transcription, and spore outgrowth. *Antimicrob. Agents Chemother* v. 22, p. 785–790,1982.

DANG, Y.; ZHAO, F.; LIU, X.; FAN, XU, HUANG, R.; GAO, W.; WANG, S.; YANG, C. Enhanced production of antifungal lipopeptide iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 through metabolic engineering and culture conditions optimization. *Microbial Cell Fact.* v. 68, p. 1-14, 2019.

DE MEDEIROS, L. S. Estudo químico e biológico de micro-organismos endofíticos associados às frutas banana, pêra e goiaba. São Carlos 164p.

Dissertação de Mestrado em Química – Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, 2010.

DHANARAJAN, G.; MANDAL, M.; SEN, R. A combined artificial neural network modeling-particle swarm optimization strategy for improved production of marine bacterial lipopeptide from food waste. *Bioch. Engineer. Journal.* v. 84, p. 59-65, 2014.

DELEU, M.; PAQUOT, M.; NYLANDER, T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface -implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J. of Colloid and Interf. Sc.* v. 283, p. 358–365, 2005.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* v. 61, p. 47-64, 1997.

DIMKIC, I.; ZIVKOVIC, S.; BERIC, T.; IVANOVIC, Z.; GAVRILOVIC, V.; STANKOVIC, S.; FIRA, D. Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biol. Control.* v. 65, p. 312–321, 2013.

DIMKIC, I.; STANKOVIC, S.; NISAVIC, M.; PETKOVIC, M.; RISTIVOJEVIC, P.; FIRA, D.; BERIC, T. The profile and antimicrobial activity of *Bacillus* lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Front. Microbiol.* v. 8, p. 1500, 2017.

DUHAN, P.; BANSAL, P.; RANI, S. Isolation, identification and characterization of endophytic bacteria from medicinal plant *Tinospora cordifolia*. *South African J. of Botany.* 1-7, 2020.

EEMAN, M.; PEGADOB, L.; DUFRENEC, Y. F.; PAQUOT, M.; DELEU, M. Influence of environmental conditions on the interfacial organisation of fengycin, a bioactive lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*. *J. of Colloid and Interf. Sc.* v. 329, p. 253–264, 2009.

ELJOUNAIDI, K.; LEE, S. K.; AND BAE, H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. *Biol. Control.* v. 103, p. 62–68, 2016.

ESMAEEL, Q.; PUPIN, M.; KIEU, N.P.; CHATAIGNÉ, G.; BÉCHET, M.; DERAVAL, J.; KRIER, F.; HÖFTE, M.; JACQUES, P.; LECLÈRE, V. Burkholderia genome mining for nonribosomal peptide synthetases reveals a great potential for novel siderophores and lipopeptides synthesis. *MicrobiologyOpen*, p. 1–15, 2016.

ESPINASSE, S.; GOHAR, M.; LERECLUS, D.; SANCHIS, V. An ABC transporter from *Bacillus thuringiensis* is essential for β -exotoxin I production. *J. Bacteriol.* v. 184, p. 5848-5854. 2002.

FALARDEAU, J.; WISE, C.; NOVITSKY, L.; AVIS T. J. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of

Bacillus subtilis lipopeptides on plant pathogens. J. Chem. Ecol. v. 39, p. 869–878, 2013.

FAHIM, S.; DIMITROV, K.; GANCEL, F.; VAUCHEL, P.; JACQUES, P.; IORDAN, NIKOV, I. Impact of energy supply and oxygen transfer on selective lipopeptide production by *Bacillus subtilis* BBG21. Bioresour. Technol. v. 126, p. 1–6. 2012.

FAHIM, S.; DIMITROV, K.; VAUCHEL, P.; GANCEL, F.; DELAPLACE, G.; JACQUES, P.; NIKOV, I. Oxygen transfer in three 134 phase inverse fluidized bed bioreactor during biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. Biochemical Engin. J. v. 7, p. 70-76, 2013.

FAN, B.; BLOM, J.; KLENK, P. H.; BORRIS, R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus siamensis* Forman “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex. Front. Microbiol. v. 8, p. 22, 2017.

FARIA, A. F.; STÉFANI, D.; VAZ, B. G.; SILVA, I. S.; GARCIA, J. S.; EBERLIN, M. N.; GROSSMAN, M. J.; ALVES, O. L.; DURRANT, L. R. Purification and structural characterization of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis* LSFM-05 grown on raw glycerol. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. v. 38, p. 863–871, 2011.

FARZAND, A.; MOOSA, A.; ZUBAIR, M.; KHAN, A. R.; HANIF, A.; TAHIR, H. A. S.; GAO, X. Marker assisted detection and LC-MS analysis of antimicrobial compounds in different *Bacillus* strains and their antifungal effect on *Sclerotinia sclerotiorum*. Biol. Contol. v. 133, p. 91-102, 2019.

FARZAND, A.; MOOSA, A.; ZUBAIR, M.; KHAN, A. R.; AYAZ, M.; MASSAWE, V. C.; GAO, X. Transcriptional Profiling of Diffusible Lipopeptides and Fungal Virulence Genes During *Bacillus amyloliquefaciens* EZ1509-Mediated Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology, v. 110, n. 2, 317-326, 2020.

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

FIRA, D.; DIMKIC, I.; BERIC, T.; LOZO, J.; STANKOVIC, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. J. of Biotech. v. 285, p. 44-55, 2018.

FRANK, A. C.; GUZMÁN, J. P. S.; SHAY, J. E. Transmission of Bacterial Endophytes. Microorganisms. v. 5, p. 70, 2017.

FUKUMOTO, J. Studies on the production of bacterial amylase. I. Isolation of bacteria secreting potent amylase and their distribution. Nipp. Nogei Kaggakai. v. 19, p. 487–503, 1943.

FUKUMOTO, J. Studies on the production of bacterial amylase. II. Bacterial and physiological nature. Nipp. Nogei Kaggakai. v. 19, p. 643–650, 1943.

GARVEBA, P.; Van Veen, I. A; Van Elsas, J. D. Predominant *Bacillus* spp. In: Agricultural soil under different management regimes via PCR-DGGE. Microbial Ecology. v. 45, p. 302- 316, 2003.

GEUDENS, N.; MARTINS, J. C. Cyclic lipodepsipeptides From *Pseudomonas* ssp.- Biological Swiss-Army Knives. Front. Microbiol. v. 9, p. 1-18, 2018.

GOND, S. K.; BERGEN, M. S.; TORRES, M. S.; and WHITE, J. F. Jr. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. Microbiol. Res. v. 172, p. 79–87, 2015.

GONG, A-D.; LI, H-P.; YUAN, Q-S.; SONG, X-S.; YAO, W.; HE, W-J., et al. Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium graminearum*. PLoS ONE. v. 10, 2015.

GONZALEZ, D.J., HASTE, N.M., HOLLANDS, A., FLEMING, T.C., HAMBY, M., POGLIANO, K., NIZET, V., DORRESTEIN, P.C. Microbial competition between *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* monitored by imaging mass spectrometry. Microbiology v. 157, p. 2485–2492, 2011.

GORDON, R.E.; HAYNES, W. C.; PANG, C. H.-N. The genus *Bacillus*. Washington, DC: U.S. Government Printing Office. 1973.

GRADY, E. N.; MACDONALD, J.; LIU, L.; RICHMAN, A.; YUAN, Z. C. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. Microbiol. Cell. Fact. v. 15, p. 203–203, 2016.

GRANGEMARD, I.; WALLACH, J.; MAGET-DANA, R.; PEYPOUX, F. Lichenysin: a more efficient cation chelator than surfactin. Appl. Biochem. Biotechnol. v. 90, p. 199–210, 2001.

GRAU, A.; GÓMEZ FERNÁNDEZ, J. C.; PEYPOUX, F.; ORTIZ, A. A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles. Bioch. 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.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and I5N in biological fluids. Anal. Biochem. v. 126, p.131-136, 1982.

GROUPÉ, V.; PUGH, L.H.; WEISS, D. KOCHI, M. Observations on Antiviral Activity of Viscosin. Exp. Biol. Med. v. 78, p.354–358, 1951.

GROVE D. C, RANDALL, W. A (1955). Assay methods of antibiotics. pp.91-93. Medical Encyclopedia, Inc. New York.

GU, Q., YANG, Y., YUAN, Q., SHI, G., WU, L., LOU, Z., HUO, R., WU, H., BORRISS, R., GAO, X. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* involved in the antagonistic interaction with the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 83, p.2017.

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

GUNTHER, E. *Ethnobotany of western Washington*, Seattle. University of Washington Publications in Anthropology. v. 10, p.1-62, 1945.

HARDOIM, P.; OVERBEEK, L.; ELSAS, J. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiol.* v. 16, p. 463-471, 2008.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A.M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within Plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 79, p. 293–320, 2015.

HARLEY, J. P. 2005. *Laboratory exercises in microbiology*. 6 a ed. New York: Mac Graw- Hill Companies. 466 p.

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

HELFRICH, E. J.; PIEL, J. Biosynthesis of polyketides by trans-AT polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* v. 33, p.231–316, 2016.

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

HIRADATE, S.; YOSHIDA, S.; SUGIE, H.; YADA, H.; FUJII, Y. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry* v. 61, p. 693-698, 2002.

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.

HUE, N.; SERANI, L.; LAPRÉVOTE, O. Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high-energy tandem mass spectrometry. *Rapid Comm. in Mass Spectr.* v. 15, p.203-209, 2001.

HUI, C.; GUO, X.; SUN, P.; KHAN, R. A.; ZHANG, Q.; LIANG, Y.; ZHAO, Y. Removal of nitrite from aqueous solution by *Bacillus amyloliquefaciens* biofilm adsorption. *Bioresource Technol.* v. 248, p.146-152, 2018.

HUSSAIN, A.; ARNOLD, J. J.; KHAN, M. A.; AHSAN, F. Absorption enhancers in pulmonary protein delivery. *J. of Control. Rel.* v. 94, p.15-24, 2004.

HUSZCZA, E.; BURCZYK, B. Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. *Zeitsch. für Naturforsch.* v. 61, p. 727–733, 2006.

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

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

JAKUBIEC-KRZESNIAK, K.; RAJNISZ-MATEUSIAK, A.; GUSPIEL, A.; ZIEMSKA, J.; AND SOLECKA, J. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Pol. J. Microbiol* v. 67, p. 259–272, 2018.

JHA, S. S.; JOSHI, S. J.; GEETHA, S. J. Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. *Bras. J. of Microbiol.* v. 47, p. 955–964, 2016.

JING, C.; XIN, S.; HUI, Z.; YINBO, Q.; Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 501–506, 2006.

JOSHEE, N.; MENTREDDY, S. R.; YADAV, A. K. Mycorrhizal fungi and growth and development of micropropagated *Scutellaria integrifolia* plants. *Ind. Crop Prod.* v. 25, p.169-177, 2007.

KAMEDA, Y.; OUHIRA, S.; MATSUI, K.; KANATOMO, S.; HASE, T.; ATSUSAKA, T. Antitumor Activity of *Bacillus natto*. Isolation and Characterization of Surfactin in the Culture Medium of *Bacillus natto* KMD 2311. *Chem. Pharm. Bull.* v. 22, p. 938-944, 1974.

KAJIMURA, Y.; SUGIYAMA, M.; KANEDA, M. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. *J. Antibiot.* v. 48, p.1095–1103, 1995.

KAKI, A. A.; SMARGIASSO, N.; ONGENA, M.; KARA, A. M.; NASSIM, M.; DE PAUW, E. Characterization of new fengycin cyclic lipopeptide variants produced by *Bacillus amyloliquefaciens* (ET) originating from a salt lake of Eastern Algeria. *Curr. Microbiol.* v. 77, p. 443-451, 2020.

KANDEL, L.; JOUBERT, P.M.; DOTY, S. L. Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants *Shyam. Microorganisms.* v. 5, p.1-26, 2017.

KANDEL, S.L.; FIRRINCIELI, A.; JOUBERT, P.M.; OKUBARA, P.A.; LESTON, N.D.; MCGEORGE, K.M.; MUGNOZZA, G.S.; HARFOUCHE, A.; KIM, S.H.;

DOTY, S.L. An in vitro study of bio-control and plant growth promotion potential of salicaceae endophytes. *Front. Microbiol.* v. 8, p.1–16, 2017.

KASPAR, F.; NEUBAUER, P.; GIMPEL, M. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. *J. Nat. Prod.* v. 82, p.2038–2053, 2019.

KEVANY, B. M.; RASKO, D. A.; THOMAS, M. G. Characterization of the Complete Zwittermicin A Biosynthesis Gene Cluster from *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* v. 75, p.1144–1155, 2008.

KHAN Z.; KIM S. G.; JEON, Y. H.; KHAN, H. U.; SON, S. H.; KIM, Y. H. A plant growth promoting *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode. *Biores. Technol.* v. 99, p.3016-3023, 2008.

KIKUCHI, T.; HASUMI, K. Enhancement of plasminogen activation by surfactin C: augmentation of fibrinolysis in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Struct. and Mol. Enzymol.* v. 1596, p.234-245, 2002.

KIM, H. S.; YOON, B. D.; LEE, C. H.; SUH, H. H.; OH, H. M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *J. Ferment. Bioeng.* v. 84, p.41-46, 1997.

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 Pharmacol.* v. 55, p.975-985, 1998.

KIM, H. S.; JEON, J. W. ; KIM, B. H.; AHN, C. Y.; MOCK OH, H.; YOON, B. D. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Applied Microbiol Biotechnol.* v. 70, p.391-396, 2006.

KIM, H. Y.; LEE, T. S. Toxicity and characteristics of antifungal substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* IUB158-03. *J. Life Sci.* v. 19, p.1672–1678, 2009.

KIM, K. M.; LEE, J. Y.; KIM, C. K.; KANG, J. S. Isolation and characterization of surfactin produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. *Arch. of Pharmacol. Resear.* v. 32, p.711–715, 2009.

KIM, P. I.; RYU, J.; KIM, Y. H.; CHI, Y. T. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. of Microbiol. and Biotechnol.* v. 20, p.138-145, 2010.

KOCH, R. Die Ätiologie der Milbrandkrankheit, begründet die Entwicklungsgesicht des *Bacillus Anthracis*. *Beitrag Biol.* v. 2, p.277–310, 1876.

KOUMOUTSI, A.; CHEN, X.; HENNE, A.; LIESEGANG, H.; HITZEROTH.; FRANKE, P.; VATER, J.; BORRISS, R. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* v. 186, p.1084-1096, 2004.

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *J. Colloid. Interface Sci.* v. 204, p.1–8, 1998.

KRACHT, M.; ROKOS, H.; OZEL, M.; KOWALL, M.; PAULI, G.; VATER, J. Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. *J. Antibiot.* v. 52, p.613–619, 1999.

KUMAR, V.; KUMAR, A.; PANDEY, K. D.; ROY, B. K. Isolation and characterization of bacterial endophytes from the roots of *Cassia tora* L. *Ann. Microbiol.* v. 65, p.1391-1399, 2015.

KWA, A. KOSIAKOU, S. K.; TAM, V. H.; FALAGAS, M. E. Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E). *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* v. 5, p.811–821, 2007.

LANDMAN, D.; GEORGESCU, C.; MARTIN, D. A.; QUALE, J. Polymyxins revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 21, p.449–465, 2008.

LECLERE, V.; BECHETM, ADAM A.; GUEZ, J. S; WATHELET, B.; ONGENA, M.; THONART, P.; GANCEL, F.; CHOLLET-IMBERTM; JACQUES, P. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl Environ Microbiol.* v. 71, p. 4577–4584, 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. *Arch. Microbiol.* v. 188, p.307-312, 2007.

LEONARDI, D.; LAMAS, M. C.; OLIVIERI, A. C. Multiresponse optimization of the properties of albendazole–chitosan microparticles. *J. Pharmaceut. Biomed.* v. 48, p.802-807, 2008.

LI Yi-M.; HADDAD, N.; YANG, S-Z.; MU, B-Z. Variants of lipopeptides produced by *Bacillus licheniformis* HSN221 in different medium components evaluated by a rapid method ESI-MS. *Int. J. Pept. Res. Ther.* v. 3, p.229–235, 2008.

LIAO, J.-H.; CHEN, P.-Y.; YANG, Y.-L.; KAN, S.-C.; HSIEH, F.-C.; AND LIU, Y.-C. Clarification of the antagonistic effect of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 against *Pyricularia oryzae* via in situ MALDI-TOF IMS analysis. *Molecules* v. 21, p.1670, 2016.

LIU, J.W.; HUNG, Y.J.; YANG, C.H.; CHEN, Y.C. The antimicrobial activity of gramicidin A is associated with hydroxyl radical formation. PLoS ONE, v. 10, p. 2015.

LIMA, T. A.; ETCHEGARAY, A.; MACHINI, M. T. Design, synthesis and valued properties of surfactin over simplified analogues. Amino Acids. v. 52, p. 25-33, 2020.

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.

LIU, X.; HADDAD, N. I. A; YANG, S.; MU, B. Structural Characterization of Eight Cyclic Lipopeptides Produced By *Bacillus subtilis* HSO121. Protein and Peptide Lett. v. 14, p.766-773, 2007.

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

LIU, R-F., ZHANG, D-J.; LI, Y-G.; TAO, L-M.; TIAN, L. A New Antifungal Cyclic Lipopeptide from *Bacillus marinus* B-9987. Helvetica Chimica Acta. v. 93, p. 2419-2425, 2010.

LIU, X.; REN, B.; GAO, H.; LIU, M.; DAI, H.; SONG, F.; YU, Z.; WANG, S.; HU, J.; KOKARE, C. R.; ZHANG, L. Optimization for the production of surfactin with a new additive antifungal activity. PLoS One. v. 7, p.1-9, 2012.

LIU, S-W.; JIN, J.; CHEN, C.; LIU, J-M.; LI, J-Y.; WANG, F-F.; JIANG, Z-K.; HU, J-H.; GAO, Z-X.; YAO, F.; YOU, X-F.; SI, S-Y.; SUN, C-H. PJS, a novel isocoumarin with hexahydropyrimidine ring from *Bacillus subtilis* PJS. J. Antibio. v. 66, p.281-284, 2013.

LIU, J.; HAGBERG, I.; NOVITSKY, L.; HADJ-MOUSSA, H.; AVIS, T. J. Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. Fungal Biol. v. 118, p.855–861, 2014.

LIU, B.; LIU, J.; JU, M.; LI, X.; YU, Q. Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. Marine Pollution Bullet. v. 107, p. 46-51, 2016.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. Crit. Rev. in Plant Sci. v. 21, p.583–606, 2002.

LOGAN, N. A.; BERKELEY, R. C. W. Identification of *Bacillus* Strains Using the API System. Microbiology. v. 130, p.1871-1882, 1984.

LOLL, P. J.; UPTONA, E. C.; NAHOUMA, V.; ECONOMOUA, N. J.; COCKLINA S. The high resolution structure of tyrocidine A reveals an amphipathic dimer. *Biochim Biophys Acta*. v. 1838, n. 5, p. 1199–1207, 2014.

LUO, R.; RUAN, L-F.; ZHAO, C-M.; WANG, C-X.; PENG, D-H.; SUN, M. Validation of the Intact Zwittermicin A Biosynthetic Gene Cluster and Discovery of a Complementary Resistance Mechanism in *Bacillus thuringiensis*. *Antimic. Agents and Chem*. v. 55, p.4161-4169, 2011.

LUO, C.; CHEN, Z.; GUO, J. Y.; LIU, X.; WANG, X.; LIU, Y.; LIU, Y. Cyclic lipopeptide antibiotic Locillomycin (Locillomycin-A, Locillomycin-B, Locillomycin-C) and methods of making and using the same. Patent Application Publication. US 2015/0080292 A1, 2015.

LV, J.; DA. R.; CHENG, Y.; TUO, X. WEI, J.; JIANG, K.; MONISAYO, A. O.; HAN, B. Mechanism of Antibacterial Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* C-1 Lipopeptide toward Anaerobic *Clostridium difficile*. *Hindawi Biomed Res. Intern*. p. 1-12, 2020.

MA, Z.; WANG, N.; HU, J.; WANG, S. Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin A produced by a marinederived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A. *J. Antibiot*. v. 65, p.317–322, 2012.

MA, Z.; HU, J.; WANG, X.; WANG, S. NMR spectroscopic and MS/MS spectrometric characterization of a new lipopeptide antibiotic bacillopeptin B₁ produced by a marine sediment-derived *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B74. *J. Antibiot*. v. 67, p.175–178, 2014.

MALFANOVA, N.; FRANZIL, L.; LUGTENBERG, B.; CHEBOTAR, V.; ONGENA, M. Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. *Arch. Microbiol*. v. 194, p.893-899, 2012.

MANN, M.; MENG, C. K.; FENN, J. B. Interpreting Mass Spectra of Multiply Charged Ions. *Anal. Chem*. v. 61, p.1702, 1989.

MAGET-DANA, R.; PTAK, M. Interfacial Properties of the Antifungal Iturins on Various Electrolyte Solutions. *J. of Colloid and Int. Sci*. v. 149, p.174-183, 1992.

MAGET-DANA, R.; PEYPOUX, F. Iturins, a special class of pore-forming Lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*, v. 87, p.151-174. 1994.

MADAN, T.; KISHORE, U.; SINGH, M.; STRONG, P.; CLARK, H.; HUSSAIN, E. M.; REID, K. B. M.; SARMA, P. U. Lung surfactant protein A (SP-A) and D (SP-D) suppress eosinophilia and specific IgE antibodies in a murine model of fungal hypersensitivity. *The Journal of Clinical Investigation*, p. 107-467, 2001.

MARTINEZ-LUIZ, S.; GOMEZ, J.F.; SPADAFORA, C.; GUZMAN, H.M.; GUTIERREZ, M. Antitrypanosomal alkaloids from the marine bacterium *Bacillus pumilus*. *Molecules*, v. 17, p.11146-11155, 2012.

MARTÍNEZ-NÚÑEZ, M. A.; LÓPEZ, V. E. L. Y. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. *Sustain. Chem. Process.* v. 4, n.13, p. 1-8, 2016.

MATA-SANDOVAL, J. C.; KARNS, J.; TORRENS, A. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UG2. *Microbiology Research*, v. 155, p.249-256, 2001.

MEDEOT, D. B.; BERTORELLO, M.; LIAUDAT, J. P.; ALVAREZ, F.; FLORES-CÁCERES, M. L.; JOFRÉ, E. Improvement of biomass and cyclic lipopeptides production in *Bacillus amyloliquefaciens* MEP 2 18 by modifying carbon and nitrogen sources and ratios of the culture media. *Biol. Control.* v. 115, p.119–128, 2017.

MEENA, K. R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; KANWAR, S. S. Two factor at a time approach by response surface methodology to aggrandize the *Bacillus subtilis* KLP2015 surfactin lipopeptide to use as antifungal agent. *J. of King S. University-Science*, p. 1- 11, 2018.

MEJRI, S.; SIAH, A.; COUTTE, F.; MAGNIN-ROBERT, M.; RANDOUX, B.; TISSERANT, B.; KRIER, F.; JACQUES, P.; REIGNAULT, P.; HALAMA, P. Biocontrol of the wheat pathogen zymoseptoria tritici using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* v. 25, p.29822–29833, 2017.

MERCADO-BLANCO, J.; LUGTENBERG, B. Biotechnological Applications of Bacterial Endophytes. *Curr. Biotechnol.* v. 3, p.60–75, 2014.

MESQUITA, A. S. S. Seleção de bactérias endofíticas Amazônicas produtoras de lipopeptídeos. 2015. 141 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, (AM), 2015.

MIAO, V.; COEFFET-LEGAL, M. F.; BRIAN, P.; BROST, R.; PENN, J.; WHITING, A.; MARTIN, S.; FORD, R.; PARR, I.; BOUCHARD, M.; C.; SILVA, J.; WRIGLEY, S. K. AND BALTZ, R. H. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry *Microbiology*, v. 151, p.1507–1523, 2005.

MNIF, I.; CHAABOUNI-ELLOUZE, S.; GHRIBI, D. Optimization of the nutritional parameters for enhanced production of *B. subtilis* SPB1 biosurfactant in submerged culture using response surface methodology. *Biotechnol. Res. Int.* 2012.

MNIF, I.; GHRIBI, D. Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Peptide Science*, v. 104, p.129-147, 2015.

MILIUTE, I.; BUZAITE, O.; BANIULIS, D.; STANYIS, V. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Zemdirbyste-Agriculture* v. 102, p.465–478, 2015.

MITTER, B.; PETRIC, A.; SHIN, M. W.; CHAIN, P. S.; HAUBERG-LOTTE, L.; REINHOLD-HUREK, B.; NOWAK, J.; SESSITSCH, A. Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. *Front. Plant Sci.* v. 4, p.1-15, 2013.

MITTER, B.; PFAFFENBICHLER, N.; FLAVELL, R.; COMPANT, S.; ANTONIELLI, L.; PETRIC, A.; BERNINGER, T.; NAVEED, M.; SHEIBANI-TEZERJI, R.; VON MALTZAHN, G.; et al. A new approach to modify plant microbiomes and traits by introducing beneficial bacteria at flowering into progeny seeds. *Front. Microbiol.* v. 8, p.1–10, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v. 65, n. 55, 1983.

MOYNE, A-L, CLEVELAND, T. E, TUZUN, S. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiol. Lett.* v. 234, p.43–49, 2004.

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

MOREJON, M. C.; LAUB, A.; KALUDEROVIC, G. N.; PUENTES, A. R.; HMEDAT, A. N.; OTERO-GONZALEZ, A. J.; RIVERA, D. G.; WESSJOHANN, L. A. A multicomponent macrocyclization strategy to natural product-like cyclic lipopeptides: synthesis and anticancer evaluation of surfactin and mycosubtilin analogues. *Organic e Biom. Chemistry.* v. 15, p.3628-3637, 2017.

MU, X.; TANG, W. K.; DONG, N.; LI, M.; SIU, C. K.; CHU, I. K. C α –C β bond cleavage occurs at the side chain of the N-terminal phenylalanine residue during CID of tyrosine-containing peptide radical cations. *International Journal of Mass Spect.* v. 435, p.333-341, 2019.

MULLIGAN, C. N., Environmental applications for biosurfactants. *Pollut.* v. 133, p.183–98, 2005.

NAGARAJKUMAR, M.; BHASKARAN, R.; VELAZHAHAN, R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol. Res.* v. 159, p.73-78, 2004.

NANJUNDAN, J.; RAMASAMY, R.; UTHANDI, S.; PONNUSAMY, M. Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of

lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* SR1. Microbial Pathogenesis. v. 128, p. 374-380, 2019.

NARAYANA, K. K. C.; ASWATHANARAYAN, J. B.; VITALL, R. R. Endophytic Peptides – A. Source of Therapeutic Agents. v. 18, p. 284-290, 2017.

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. J. Antibiot. v. 43, p.267–280, 1990.

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. Proc. of the Nat. Acad. of Sci. of the U. S. of Am. v. 103, p.17462-17467, 2006.

NIELSEN, T.H.; CHRISTOPHERSEN, C.; ANTHONI, U.; SORENSEN J. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54, J. Appl. Microbiol. v. 86, p.80–90, 1999.

NIKOLIC, I.; BERIC, T.; DIMKIC, I.; POPOVIC, T.; LOZO, J.; FIRA, D.; STANKOVIC, S. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *Aptata* on sugar beet with *Bacillus pumilus* SS-10-7 and *Bacillus amyloliquefaciens* (SS-12.6 and SS-38.4) strains. J. of Appl. Microbiol. v. 126, p.165-176, 2018.

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*. J. Antibiot, v. 39, p.755-761, 1986.

NORIYASU, I.; SHAHEDUR, R. M.; TAKASHI, A. Production of iturin A homologues under different culture conditions. J. of Env. Sci. v. 21, p.28-32, 2009.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Effect temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactina by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. J. of Ferment. and Bioeng. v. 80, p.517-519, 1995.

OLIVEIRA, J. A. M. DE, WILLIAMS, D. E.; ANDERSEN, R. J.; SARRAGIOTTO, M. H.; BALDOQUI, D. C. Pumilacidins A-E from Sediment-Derived Bacterium *Bacillus* sp. 4040 an Their Antimicrobial Activity Evaluation. J. Braz. Chem. Soc. v. 31, p.357-363, 2020.

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. Env. Microbiol. v. 9, p.1084-1090, 2007.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. v. 16, p.115–125, 2008.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Rev. Bras. Farmacogn. v. 18, p.301-307, 2008.

PANDEY, S. ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF *OCIMUM GRATISSIMUM* L. Int. J. of Pharmacy and Phar. Sc. v. 9, p.26-31, 2017.

PARK, S.Y.; KIM, Y. Surfactina inhibits immunostimulatory function of macrophages through blocking NK kB, MAPK and Akt pathway. Int. Immunoph. v. 9, p.886 - 893, 2009.

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

PEREIRA FILHO, E. R. Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados. São Carlos: EdUFSCAr, 2018.

PEREIRA, F. M. V.; PEREIRA-FILHO, E. R. APLICAÇÃO DE PROGRAMA COMPUTACIONAL LIVRE EM PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS: UM TUTORIAL. Quim. Nova, v. 41, p.1061-1071, 2018.

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. Eur J Biochem., v. 224, p. 89-96, 1994.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 51, p.553–63, 1999.

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.

PIGNATELLI M., MOYA A., TAMAMES J. EnvDB, a database for describing the environmental distribution of prokaryotic taxa. Env. Microbiol. Rep. v. 1, p.191–197, 2009.

PINCHUK, I. V.; BRESSOLLIER, P.; SOROKULOVA, I. B.; VERNEUIL, B.; URDACI, M. C. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. Res. Microbiol. v. 153, p. 269-276, 2002.

PIRTTILA, A. M. AND FRANK, A. C. Endophytes of forest trees, biology and application. Springer, The Netherlands. 319 p, 2011.

PRAKASH, V.; RANA, S. SAGAR, A. Taxomyces andreanae: A source of anticancer drug. Int. J. of Botany Studies. v. 1, p.43-46, 2016.

PRIEST, F.G.; GOODFELLOW, M.; SHUTE, L. A.; BERKELEY, R. C. W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. v. 37, p.69-71, 1987.

PUEYO, M.; BLOCH, C.; CARMONA-RIBEIRO, A.; DI MASCIO, P. Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain. Microb. Ecol. v. 57, p.367–378, 2009.

QI, G.; ZHU, F.; DU, P.; YANG, X.; QIU, D.; YU, Z.; CHEN, J.; ZHAO, X. Lipopeptide induces apoptosis in fungal cells by a mitochondriadependent pathway. Peptides v. 31, p.1978–1986, 2010.

RAMKRISHNA, S. Biosurfactants. Springer Science & Business Media, 2010.

RAAIJMAKERS, J. M.; DE BRUIJN I.; DE KOCK, M. J. D. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. Mol. Plant-Microbe Interact. v. 19, p.699–710. 2006.

RAAIJMAKERS, J. M.; DE BRUIJN, I.; NYBROE, O.; ONGENA, M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. FEMS Microbiol Rev. v. 34, p.1037–62, 2010.

RAJKUMAR, M.; NAGENDRAN, R.; LEE, K.J.; LEE, W.H.; KIM, S. Z. Influence of plant growth promoting bacteria and Cr⁶⁺ on the growth of Indian mustard. Chemosphere, v. 62, p.741-748, 2006.

RAMACHANDRAN, R.; SHRIVASTAVA, M.; NARAYANAN, N. N.; THAKUR, R. L.; CHAKRABARTI, A.; ROY, U. Evaluation of Antifungal Efficacy of Three New Cyclic Lipopeptides of the Class Bacillomycin from *Bacillus subtilis* RLID 12.1. A. Agents and Chemot. v. 62, p.1-11, 2018.

RAMALINGAM, V.; VARUNKUMAR, K.; RAVIKUMAR, V.; RAJARAM, R. Production and structure elucidation of anticancer potential surfactin from marine actinomycete *Micromonospora marina*. Proc. Biochemistry, v. 78, p.169-177, 2019.

RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; HBID, C.; JACQUES, P.; DESTAIN, J.; THONART, P. Purification of antifungal lipopeptides by reversed phase high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. v. 639, p.81-85, 1993.

REIS, R. S.; PACHECO, G. J.; PEREIRA, A. G.; FREIRE, D. M. G. Biosurfactants: Production and Applications, Biodegradation - Life of Science, Dr. Rolando Chamy (Ed.), InTech, v. 1, p.1-370, 2013.

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

ROONGSAWANG, N.; WASHIO, K.; MORIKAWA, M. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *Int. J. Mol. Sci.* v. 12, p.141–172, 2011.

ROMANO, A.; VITULLO, D.; PIETROS, A. D.; LIMA, G.; LANZOTTI, V. Antifungal Lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Strain BO7. *J. Nat. Prod.* v. 74, p. 145-151, 2011.

ROMANO, A.; VITULLO, D.; SENATORE, M.; LIMA, G.; LANZOTTI, V. Antifungal Cyclic Lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Strain BO5A. *J. Nat. Prod.* v. 76, p.2019-2025, 2013.

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*. *J. of Appl. Microbiol.* v. 103, p.969-976, 2007.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Lett.* v. 278, p.1–9, 2008.

ROSENBLUETH, B.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *The American Phytopat. Soc.* v. 19, p.827-837, 2006.

ROY, A.; MAHATA, D.; PAUL, D.; KORPOLE, S.; FRANCO, O. L.; MANDAL, S. M. Purification, biochemical characterization and self-assembled structure of a fengycin-like antifungal peptide from *Bacillus thuringiensis* strain SM1. *Front. Microbiol.* v. 4, p.332, 2013.

SA, R. B.; AN, X.; SUI, J. K.; WANG, X. H.; JI, C.; WANG, C. Q.; LI, Q.; HU, Y. R.; LIU, X.; Purification and structural characterization of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis* from poplar wood bark. *A. Plant Pathology.* v. 47, p.259-268, 2018.

SABATÉ, D. C.; BRANDAN, C. P.; PETROSELLI, G.; ERRA-BALSELLS, R.; AND AUDISIO, M. C. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus strains*. *Microbiol. Res.* v. 211, p.21–30, 2018.

SABIR, A.; EL-KHALFI, B.; ERRACHIDI, F.; CHEMSI, I.; SERRANO, A. Evaluation of the potential of some essential oils in biological control against phytopathogenic agent *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 responsible for the tomatoes speck. *J. Plant. Pathol. Microbiol.* v. 8, p.2-8, 2017.

SCHNEIDER, K.; CHEN, X. H.; VATER, J.; FRANKE, P.; NICHOLSON, G.; BORRISS, R.; SUSSMUTH, R. D. Macrolactin is the polyketide biosynthesis

product of the pks2 cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. J Nat Prod. v. 70, p.1417–1423, 2007.

SADER, H. S.; FARRELL, D.J.; JONES, R.N. Antimicrobial activity of daptomycin tested against gram-positive strains collected in European hospitals: results from 7 years of resistance surveillance (2003-2009). J. of Antim. Chemotherapy, v. 23, p.200-206, 2011.

SANGER, F.; COUJSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J. Mol. Biol. v. 25, p.441-448, 1975.

SANSINENEA, E. *Bacillus thuringiensis* biotechnology. Springer, Netherlands, 2012.

SANSINENEA, E.; SALAZAR, F.; RAMIREZ, M.; ORTIZ, A. An ultravioleta tolerant wild-type strain of melanin-producing *Bacillus thuringiensis*. Jundishapur. J. Microbiol. v. 8, p.20910, 2015.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. Microbiol. Res. v. 183, p.92–99 2016.

SARWAR, A.; BRADER, G. CORRETO, E.; VALETI, G.; ABAIDULLAH, M.; SESSITSCH, A. HAFEEZ, F. Y. Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. PloS One v. 13, p.1-15, 2018.

SCOTT, W. R.; BAEK, S. B.; JUNG, D.; HANCOCK, R. E.; STRAUS, S. K. NMR structural studies of the antibiotic lipopeptide daptomycin in DHPC micelles. Bioch. e Biophys. Acta, v. 1768, p.3116-3126, 2007.

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

SEGOND, D.; ABI KHALIL, E.; BUISSON, C.; DAOU, N.; KALLASSY, M.; LERECLUS, D.; AROSIO, P.; BOU-ABDALLAH, F.; NIELSEN LE ROUX, C. Iron acquisition in *Bacillus cereus*: The roles of IIsA and bacillibactin in exogenous ferritin iron mobilization. PLoS Pathog. v. 10, p.2014.

SHAHZAD, R., WAQAS, M., KHAN, A. L., ASAF, S., KHAN, M. A., KANG, S. M., et al. Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. Plant Physiol. Biochem. v. 106, p.236–243, 2016.

SHEPPARD, J. D.; JUMARIE, C.; COOPER, D. G.; LAPRADE, R. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. Bioch. e Biophys. Acta v. 1064, p.13-23, 1991.

SINNAEVE, D.; MICHAUX, C.; VAN HEMEL, J.; VANDENKERCKHOVE, J.; PEYS, E.; BORREMANS, F.A.M.; SAS, B.; WOUTERS, J.; MARTINS, J.C.

Structure and X-ray conformation of pseudodesmins A and B, two new cyclic lipopeptides from *Pseudomonas* bacteria. *Tetrahedron*, v. 65, p.4173–4181, 2009.

SINGH S, GHADGE V, KUMAR P.; MATHEW, D. E.; DHIMMAR, A.; SAHASTRABUDHE, H.; NALLI, Y.; RATHOD, M. R.; SHINDE, P. B. Biodiversity and Antimicrobial Potential of Bacterial Endophytes from Halophyte *Salicornia brachiata*. *BioRxiv*, 2020.

SINGH, M. KUMAR, A.; SINGH, R.; PANDEY, K. D. Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. *Biotech.* v. 7, p.315, 2017.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S., Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol.* v. 22, p.142–146, 2004.

SINGH, A. K.; RAUTELA, R.; CAMEOTRA, S. S. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus sp* strain AR2. *Microb Cell Fact.* v. 13, p.67, 2014.

SIVAPATHASEKARAM, C.; DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SARAVANAKUMAR, J.; MANDAL, M.; SEM, R. Marine Bacterium Derived Lipopeptides: Characterization and Cytotoxic Activity Against Cancer Cell Lines. *Int. J. Pept. Res. Ther.* v. 16, p.25-222, 2010.

SLEPECKY R. A.; HEMPHILL H. E. 2006. The Genus *Bacillus*-Nonmedical. ss. 530-562. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. *Prokaryotes*. Springer Science+Business Media, LLC, NY, USA.

SLIVINSKI, C. T.; MALLMANN, E.; ARAÚJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. *Process Biochemistry.* v. 47, p.1848-1855, 2012.

SOARES, M. A, LI, H. Y., BERGEN, M.; SILVA, J. M.; KOWALSKI, K. P.; WHITE, J. F. Functional role of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* in enhancing growth and disease protection of invasive English ivy (*Hedera helix* L.). *Plant Soil.* v. 405, p.107–123, 2016.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiol.* v. 56, p.845-857, 2005.

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.

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. *Microbiol. and Molec. Biol. Rev.* v. 67, p.491-502, 2003.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. Crit. Rev. in Plant Sci. v. 19, p.1-30, 2000.

SU, Y. Y.; GUO, L. D.; HYDE, K. D. Response of endophytic fungi of *Stipa grandis* to experimental plant function group removal in Inner Mongolia steppe, China. Fungal Diversity. v. 43, p.93–101, 2010.

SUCHODOISKI, J.; DERKACZ, D.; MURASZKO, J.; PANEK, J. J.; JEZIEWSKA, A.; LUKASZEWICZ, M.; KRASOWSKA, A. Fluconazole and Lipopeptide Surfactin Interplay During *Candida albicans* Plasma Membrane and Cell Wall Remodeling Increases Fungal Immune System Exposure. Pharmaceutics, v. 12, p.314, 2020.

SUMI, C. D.; YANG, B. W.; YEO, I. C.; HAHM, Y. T. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. Can. J. Microbiol. v. 61, p.93–103, 2015.

SUN, L.; LU, Z.; BIE, X.; LU, F.; YANG, S. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactin, entophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. World J. Microbiol. Biotechnol. v. 22, p.1259–1266, 2006.

SUN, D.; LIAO, J.; SUN, L.; WANG, Y.; LIU, Y.; DENG, Q.; ZHANG, N.; XU, D.; FANG, Z.; WANG, W.; GOONERATNE, R. Effect of media and fermentation conditions on surfactin and iturin homologues produced by *Bacillus natto* NT-6: LC–MS analysis. AMB Express. v. 9, p.120, 2019.

SZCZECH, M.; SHODA, M. The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB14-C on its efficacy as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani*. J. of Phytopathol. v. 154, p.370–377, 2006.

TAGHAVI, S., GARAFOLA, C., MONCHY, S., NEWMAN, L., HOFFMAN, A., WEYENS, N., BARAC, T., VANGRONVELD, J. AND VAN DER LELIE, D. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. Appl. Environ. Microbiol. v. 75, p.748-757, 2009.

TAN, R.; ZOU, W. Endophytes: a rich source of functional metabolites. Nat. Prod. Rep. v. 18, p. 448–459, 2001.

TANG, J-S.; GAO, HAO, HONG, K.; YU, Y.; JIANG, M-M.; LIN, H-P.; YE, W-C.; YAO, X-S. Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR spectral data of nine surfactin isomers. Spec. Ass. and Ref. Dat. v. 45, p. 792-796, 2007.

TAREQ, F. S.; SHIN, H. J. J. Bacilotetrins A and B, Anti-Staphylococcal Cyclic-Lipotetrapeptides from a Marine-Derived *Bacillus subtilis*. Nat. Prod. v. 80, p. 2889–2892, 2017.

TAREQ, F. S.; HASAN, C. M.; LEE, H.-S.; LEE, Y.-J.; LEE, J. S.; SUROVY, M. Z.; ISLAM, M. T.; SHIN, H. Gageopeptins A and B, new inhibitors of zoospore motility of the phytopathogen *Phytophthora capsici* from a marine-derived bacterium *Bacillus* sp. 109GGC020. *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* v. 25, p.3325–3329, 2015.

TAREQ, S. F.; LEE, A. M.; LEE, H.-S.; LEE, J.-S.; LEE, Y.-J.; SHIN, J. H. Marine natural products. *Mar. Drugs.* v. 12, p.871–885, 2014a.

TAREQ, F. S.; LEE, M. A.; LEE, H.-S.; LEE, Y.-J.; LEE, J. S.; HASAN, C. M.; ISLAM, M. T.; SHIN, H. Gageotetrins A–C, Noncytotoxic Antimicrobial Linear Lipopeptides from a Marine Bacterium *Bacillus subtilis*. *J. Org. Lett.* v. 16, p.928–931, 2014b.

TAREQ, F. S.; LEE, M. A.; LEE, H.-S.; LEE, Y.-J.; LEE, J. S.; HASAN, C. M.; ISLAM, M. T.; SHIN, H. J. Non-cytotoxic Antifungal Agents: Isolation and Structures of Gageopeptides A–D from a *Bacillus* Strain 109GGC020. *J. Agric. Food Chem.* v. 62, p.5565–5572, 2014c.

TENDULKAR, S.R.; SAIKUMARI, Y.K.; PATEL, V.; RAGHOTAMA, S.; MUNSHI, T.K.; BALARAM, P.; CHATTOO, B. B. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *J. Appl. Microbiol.* v. 103, p.2331-2339, 2007.

TEJERA-HERNÁNDEZ B.; ROJAS-BADÍA M.M.; HEYDRICH-PÉREZ M. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciências. Biológicas* v. 42, p.131-138, 2011.

THOMAS, D. W.; ITO, T. The revised structure of the peptide antibiotic esperin, established by mass spectrometry. *Tetrahedron.* v. 25, p. 1985-1990, 1969.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. In: *Microbiologia*, 6a ed, São Paulo: Artmed, p.267-393, 2003.

TORRES-MENDOZA, D.; CORONADO, L. M.; PINEDA, L. M.; GUZMÁN, H. M.; DORRESTEIN, P. C.; SPADAFORA, C.; GUTIÉRREZ, M. Pumilacidins from the Octocoral-Associated *Bacillus* sp. DT001 Display Anti-Proliferative Effects in *Plasmodium falciparum*. *Molecules*, v. 23, p.2179, 2018.

TRAGER, W and JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* v. 193, p.673-675, 1976.

TRIMBLE, M. J.; MLYNÁRCIK, P.; KOLÁR, M.; HANCOCK, R. E. W. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor Persp. In Medicine.* v. 10, p.1-22, 2016.

TRIPATHI, V. C.; SATISH, S.; HORAM, S.; RAJ, S.; AROCKIARAJ, J.; PASUPULETI, M., et al. Natural products from polar organisms: structural

diversity, bioactivities and potential pharmaceutical applications. *Polar Sci.* v. 18, p.147–166, 2018.

TRUYENS, S.; WEYENS, N.; CUYPERS, A.; VANGRONSVELD, J. Bacterial seed endophytes: Genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environ. Microbiol. Rep.* v. 7, p.40–50, 2015.

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.

VAN EPPS H. L. Rene Dubos: unearthing antibiotics. *J Exp Med.* 203:259, 2006.

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, p.888-901, 1986.

VATER, J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. *Prog. Colloid Polymer Sci.* v. 72, p.12-18, 1986.

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 Environ. Microbiol.* v. 68, p.6210-6219, 2002.

VICENTINI, F. C.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; JANEGITZ, B. C.; SANTIAGO, A.; PEREIRA-FILHO, E. R.; FATIBELLO-FILHO, O. Planejamento Fatorial E Superfície De Resposta: Otimização De Um Método Voltamétrico Para A Determinação De Ag(I) Empregando Um Eletrodo De Pasta De Nanotubos De Carbono. *Quim. Nova*, v. 34, p.825-830, 2011.

VILLARREAL-DELGADO, M.F.; VILLA-RODRÍGUEZ, E.D.; CIRACHÁVEZ, L.A.; ESTRADA-ALVARADO, M.I.; PARRA-COTA, F.I.; DE LOS SANTOS-VILLALOBOS, S. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Mex. J. Phytopathol.* v. 36, p.95-130, 2018.

VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasm properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environ. Microbiol.* v. 63, p.44-49, 1997.

WANG, J.; LIU, J.; WANG, X.; YAO, J.; YU, Z. Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. *Lett. in Appl. Microbiol.* v. 39, p.98–102, 2004.

WICAKSONO, W. A.; JONES, E. E.; CASONATO, S.; MONK, J. and RIDGWAY, H.J. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, using endophytic bacteria recovered from a medicinal plant. *Biol. Control.* v. 116, p.103–112, 2018.

XIU, P.; LIU, R.; ZHANG, D.; AND SUN, C. Pumilacidin-like lipopeptides derived from marine bacterium *Bacillus* sp. strain 176 suppress the motility of *Vibrio alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 83, p.1-14, 2017.

XU, Z.,SHAO, J.,LI, B.,YAN, X.,SHEN, Q.,ZHANG, R. Contribution of bacillomycin D In *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 79, p.808–815, 2013.

XUN-CHAO, C.; HUI, L.; YA-RONG, X.; CHANG-HONG, L. Study of endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* CC09 and its antifungal cyclic lipopeptides. *J. of Appl. Biology & Biotechnol.* v. 1, p.001-005, 2013.

YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; WRAY, V.; FREDRICKSON, H. L. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 61, p.1706–1713, 1995.

YANG, G.; WANG, J.; LU, S.; CHEN, Z.; FAN, S.; CHEN, D.; XUE, H.; SHI, W.; HE, J. Short lipopeptides specifically inhibit the growth of *Propionibacterium acnes* with dual antibacterial and anti-inflammatory action. *J Pharmacol.* v. 176, p.1603–1618, 2019.

YAO, S.; GAO, X.; FUCHSBAUER, N.; HILLEN, W.; VATER, J.; WANG, J. Cloning, sequencing, and characterization of the genetic region relevant to biosynthesis of the lipopeptides iturin A and surfactinin *Bacillus subtilis*. *Curr. Microbiol.* v. 47, p.272- 277, 2003.

YANG, H.; LI, X.; LI, X.; YU, H. SHEN, Z. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturina, fengycin, and surfactina by RP-HPLC. *Anal. Bioanal. Chem.* v. 407, p.2529–2542, 2015.

YASEEN, Y.; GANCEL, F.; BÉCHET, M.; DRINDER, D.; JACQUES, P. Study of the correlation between fengycin promoter expression and its production by *Bacillus subtilis* under different culture conditions and the impact on surfactin production. *Arch. of Microbiol.* v. 199, p.137-1382, 2017.

YHEN, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. *Biotechnol. Prog.* v. 21, p.1329-1334, 2005.

YU, G.Y.; SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L; BERTAGNOLLI, B. L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Bioch.* v. 34, p. 955-963, 2002.

YU, H.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W.; SUN, P.; QIN, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol. Rsearch.* v. 165, p.437-449, 2010.

YUAN, J.; RAZA, W.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 78, p.5942–5944, 2012.

ZAREI, I. Biosynthesis of bacitracin in stirred fermenter by *Bacillus licheniformis* using defatted oil seed cakes as substrate. *Mod Appl Sci.* v. 6, p.30, 2012.

ZAWADZKA, A.M.; ABERGEL, R.J.; NICHIPORUK, R.; ANDERSEN, U.N.; RAYMOND, K.N. Siderophore-mediated iron acquisition system in *Bacillus cereus*: identification of receptors for anthrax virulence-associated petrobactin. *Biochemistry*, v. 48, p.3645-3657, 2009.

ZGHAL, R. Z.; GHEDIRA, K.; ELLEUCH, J.; KHARRAT, M.; TOUNSI, S. Genome sequence analysis of a novel *Bacillus thuringiensis* strain BLB406 active against *Aedes aegypti* larvae, a novel potential bioinsecticide. *Internat. J. of Biol. Macromolecules*, v. 116, p.1153-1162, 2018.

ZHANG, L.; CHAOMIN, S. Fengycins, Cyclic Lipopeptides from Marine *Bacillus subtilis* Strains, Kill the Plant-Pathogenic Fungus *Magnaporthe grisea* by Inducing Reactive Oxygen Species Production and Chromatin Condensation. *Applied and Environ. Microbiol.* v. 84, p.1-17, 2018.

ZHANG, H. L.; HUA, H. M.; PEI, Y. H.; YAO, X. S. Three new cytotoxic cyclic acylpeptides from marine *Bacillus* sp. *Chem. Pharm. Bull.* v. 52, p.1029–1030, 2004.

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

ZHANG, Y., LIU, C., DONG, B.; MA, X.; HOU, L.; CAO, X.; WANG, C. Anti-inflammatory Activity and Mechanism of Surfactin in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages. *Inflammation*, v. 38, 2015.

ZHAO, J.; LI, Y.; ZHANG, C.; YAO, Z.; ZHANG, L.; BIE, X.; LU, F.; LU, Z. Genome shuffling of *Bacillus amyloliquefaciens* for improving antimicrobial lipopeptide production and an analysis of relative gene expression using FQ RT-PCR. *The J. of Industrial Microbiol. and Biotechnol.* v. 39, p.889-896, 2012.

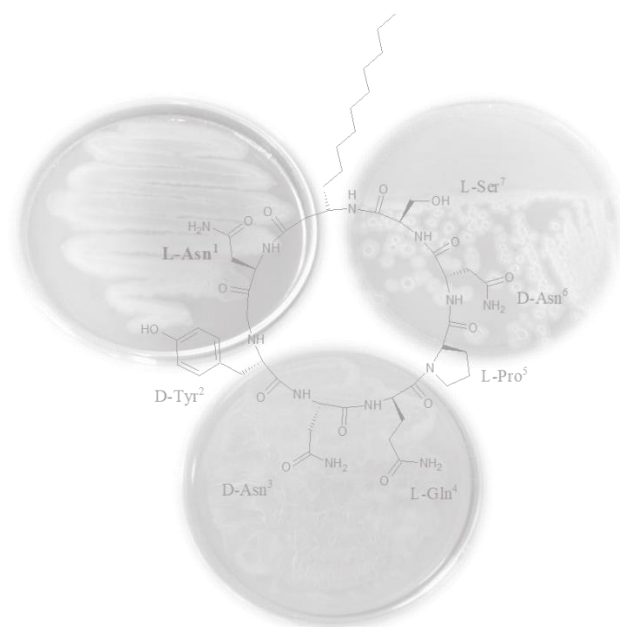
ZHAO, J.; ZHAO, P.; QUAN, C.; JIN, L.; ZHENG, W.; FAN, S. Comparative proteomic analysis of antagonistic *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 cultivated under different pH conditions. *Biotechnol Appl Biochem.* v. 62, p.: 574-581, 2015.

ZHAO H.; SHAO D.; JIANG, C.; SHI, J.; LI, Q.; HUANG, Q.; RAJOKA, M. S. R.; YANG, H.; JIN, M. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 101, p.5951–5960, 2017.

ZHIYONG, D.; ZENG, Z.; XUE, B.; DENG, Y.; SUN, M.; TANG, Y-J.; RUAN, L. *Bacillus thuringiensis* produces the lipopeptide thumolycin to antagonize microbes and nematodes. *Microbiol. Res.* v. 215, p. 22-28, 2018.

ZHU, Y.; JHIA, H.; XI, M.; XU, L.; WU, S.; LI, X. Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Bacillus amyloliquefaciens* 11568 suitable for the transformation of flavonoids. Food Chemistry. v. 214, p.39-46, 2017.

8. APÊNDICE



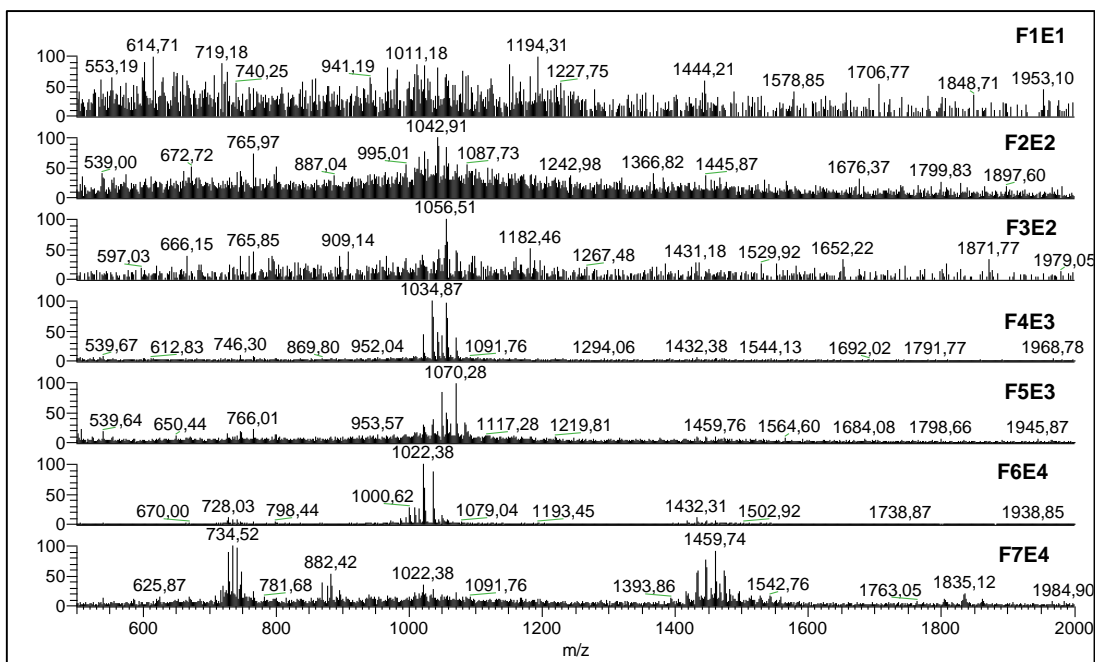


Figura 68. Espectros de ESI-MS no modo positivo do fracionamento do extrato LP164 por SPE em escala analítica.

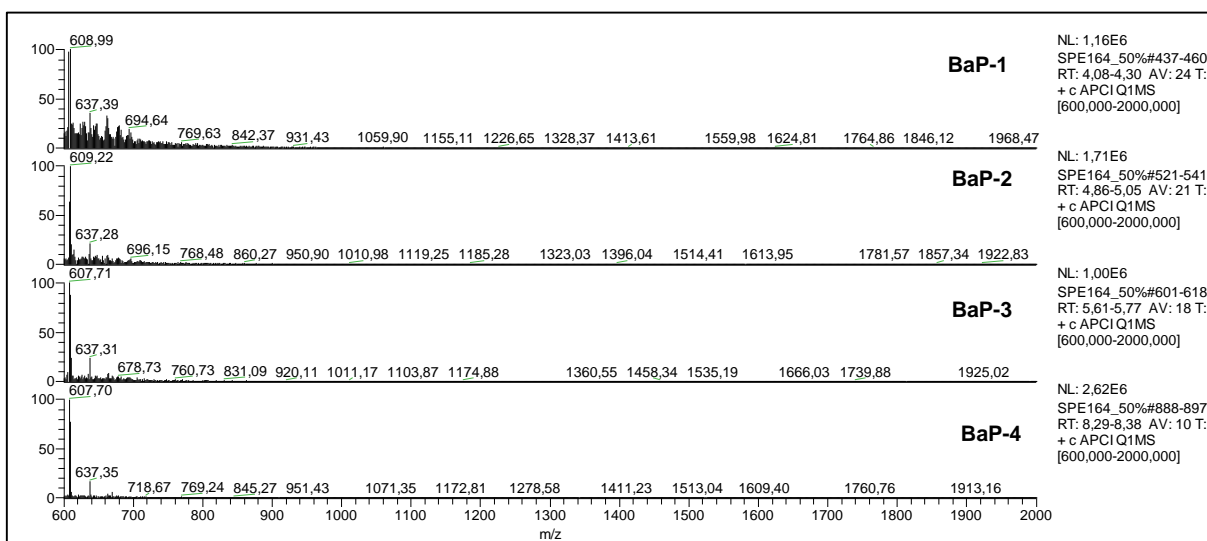


Figura 69. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH/H₂O 50% (E1).

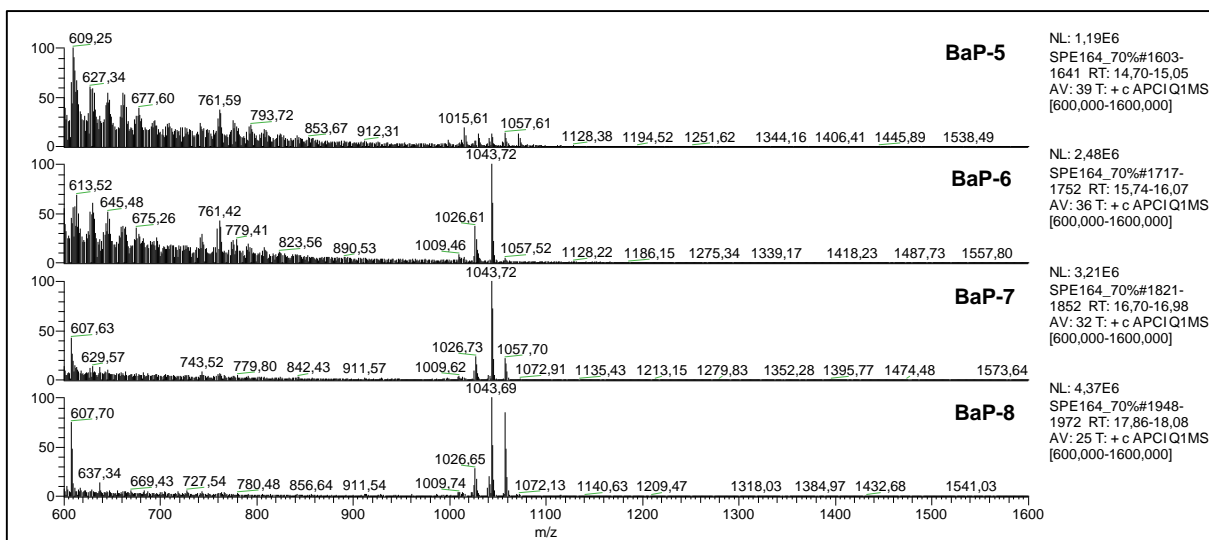


Figura 70. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH/H₂O 7:3 (E2).

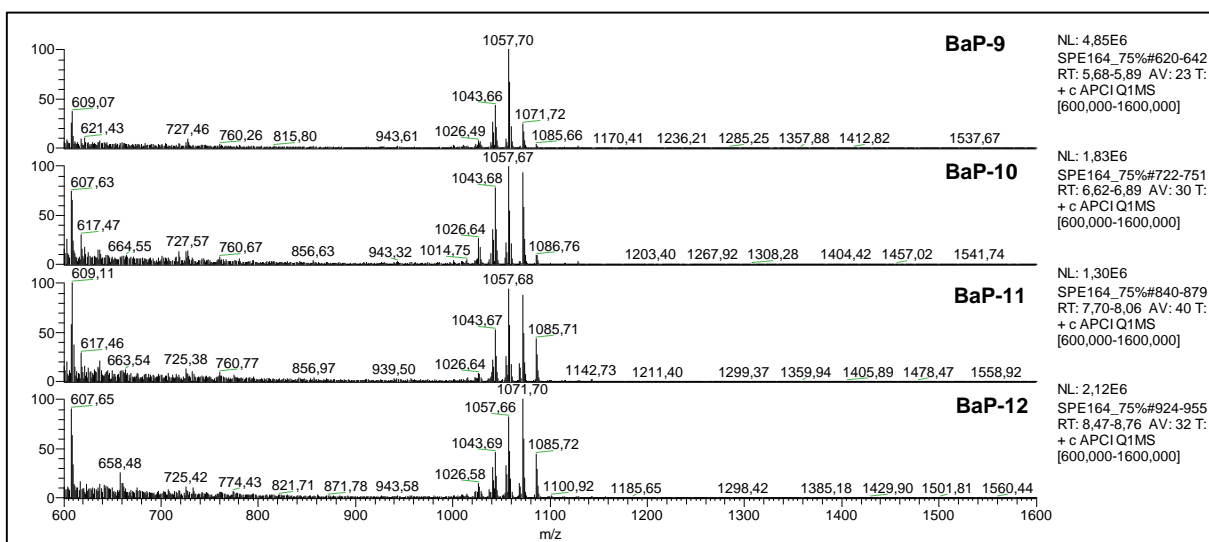


Figura 71. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH/H₂O 75:25 (E3).

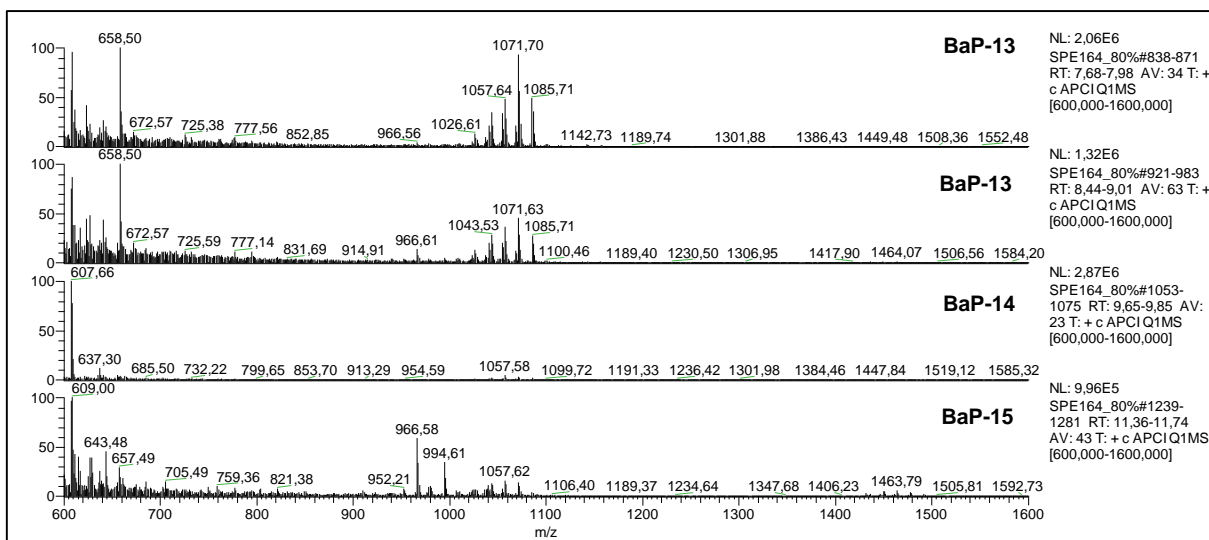


Figura 72. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH/H₂O 8:2 (E4).

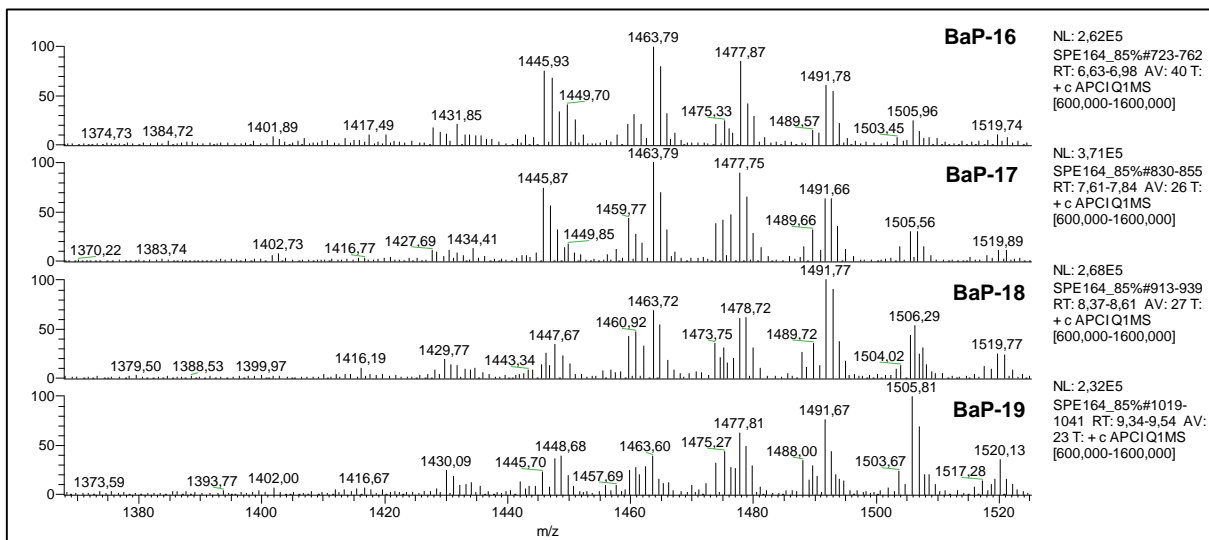


Figura 73. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH/H₂O 85:15 (E5).

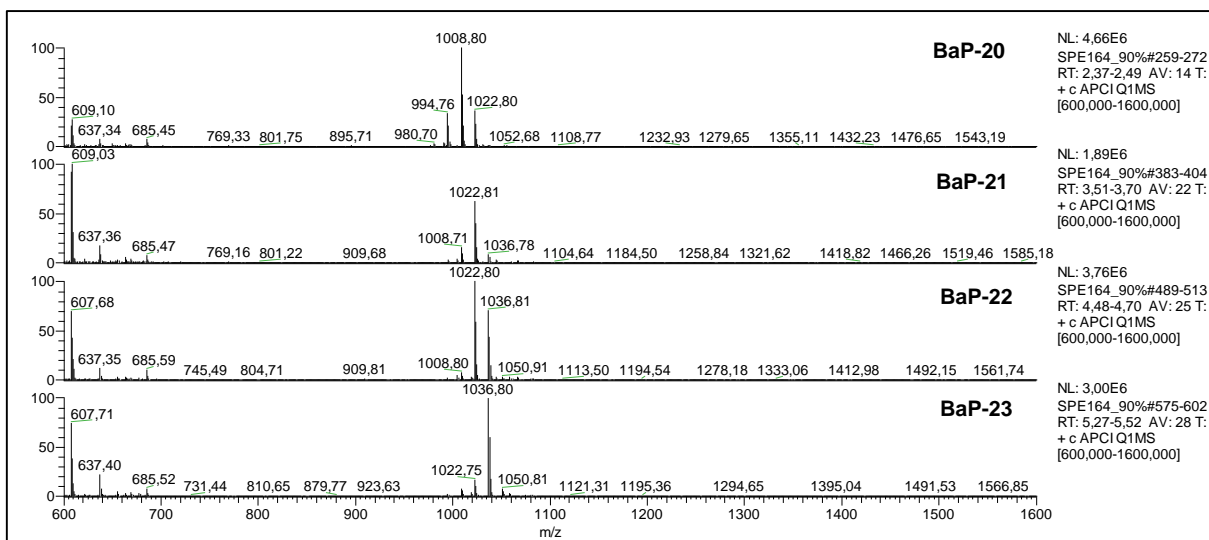


Figura 74. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH/H₂O 9:1 (E6).

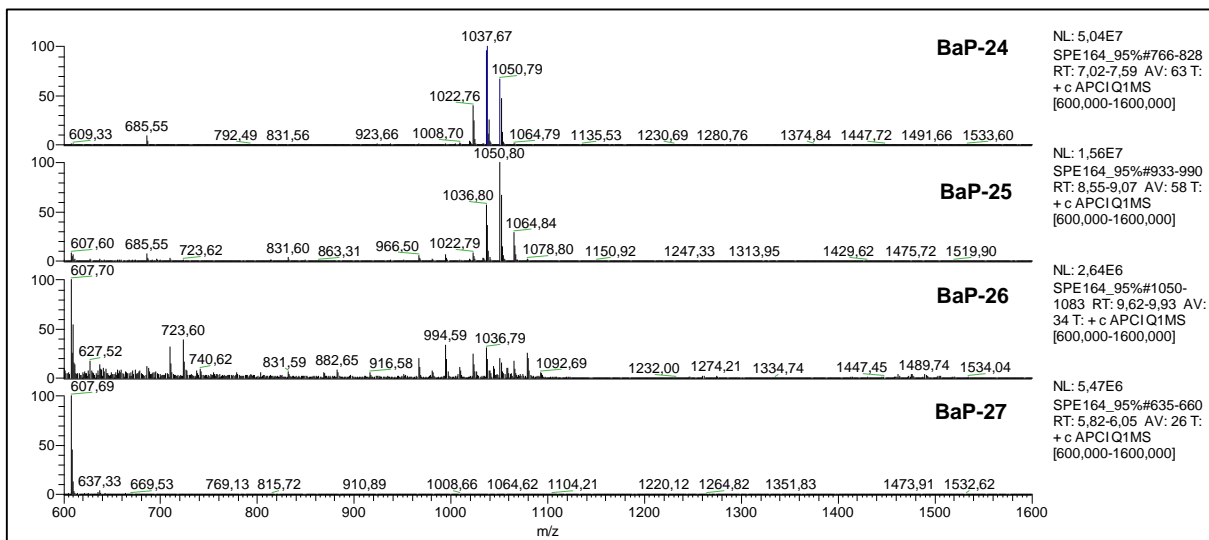


Figura 75. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH/H₂O 95:05 (E7).

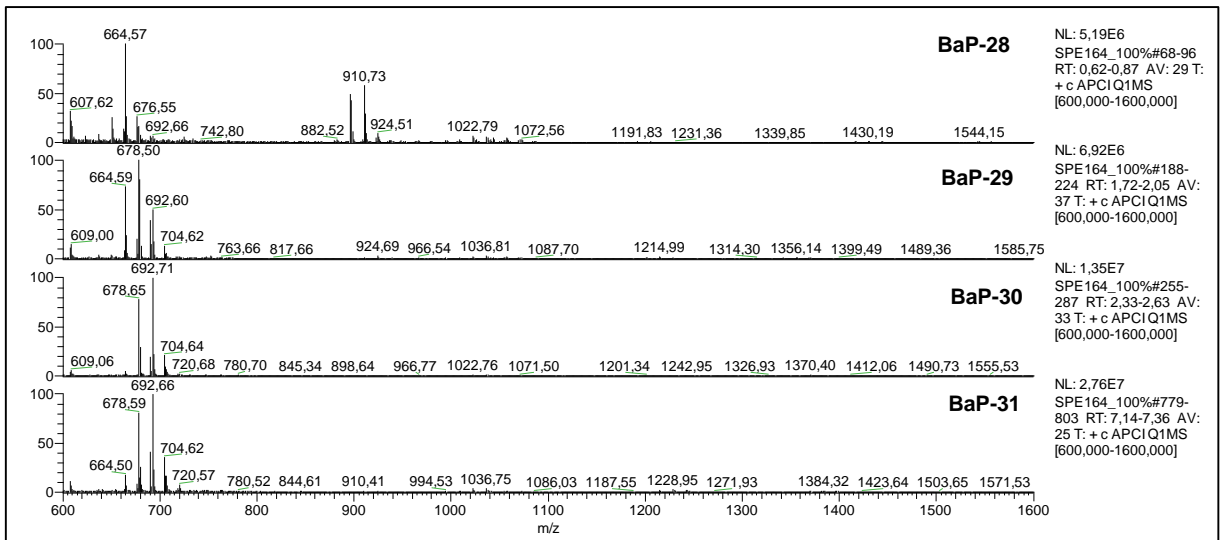


Figura 76. Espectros de APCI-MS no modo positivo das frações do extrato LP164 por SPE em escala ampliada com MeOH 100% (E8).

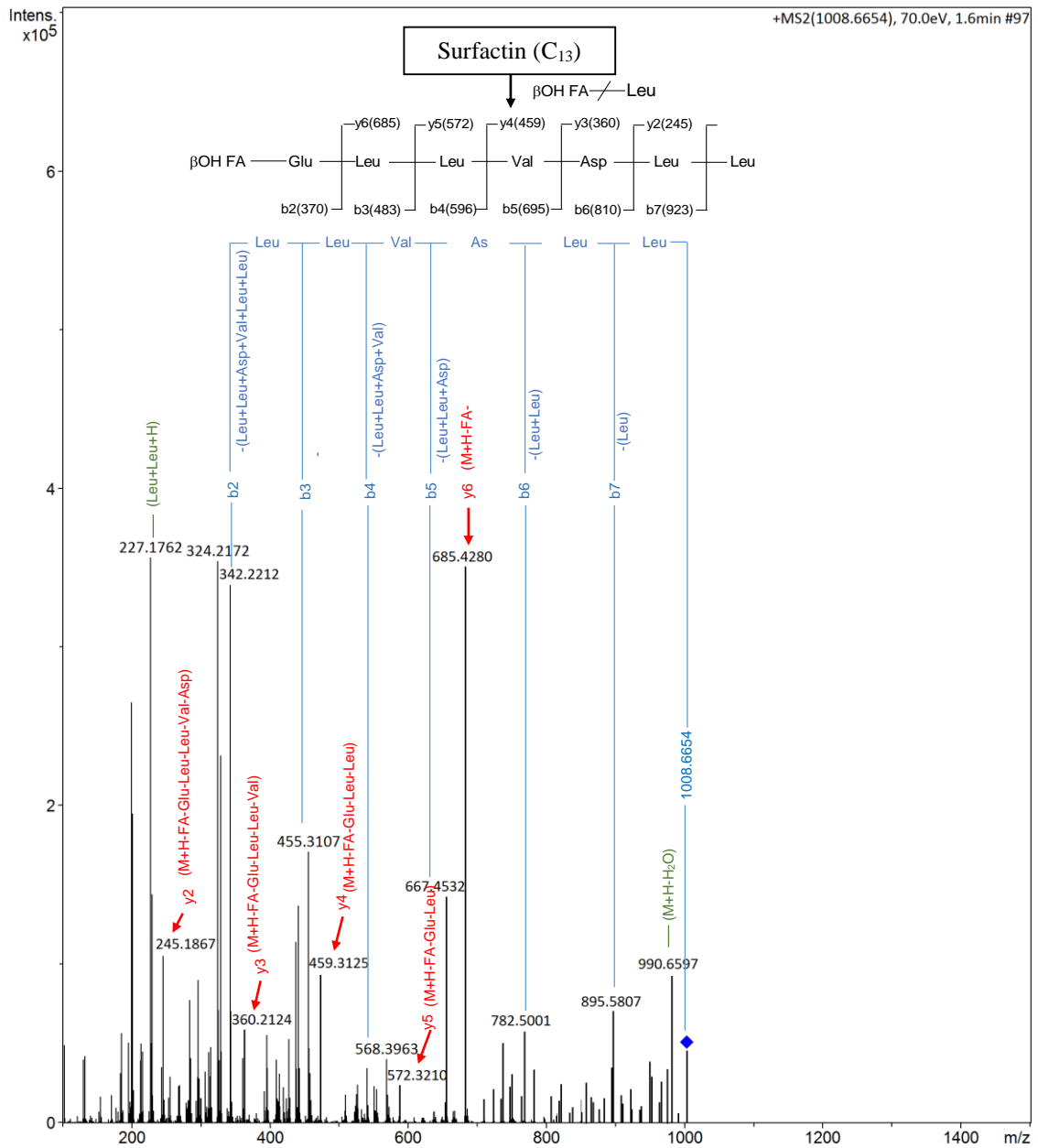


Figura 77. Espectro de fragmentação do íon $([M+H]^+)$ em m/z 1008,6654, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Surfactina A1 de *B. amyloliquefaciens*, e respectiva proposta de fragmentação para a isoforma Surfactina A (C₁₃).

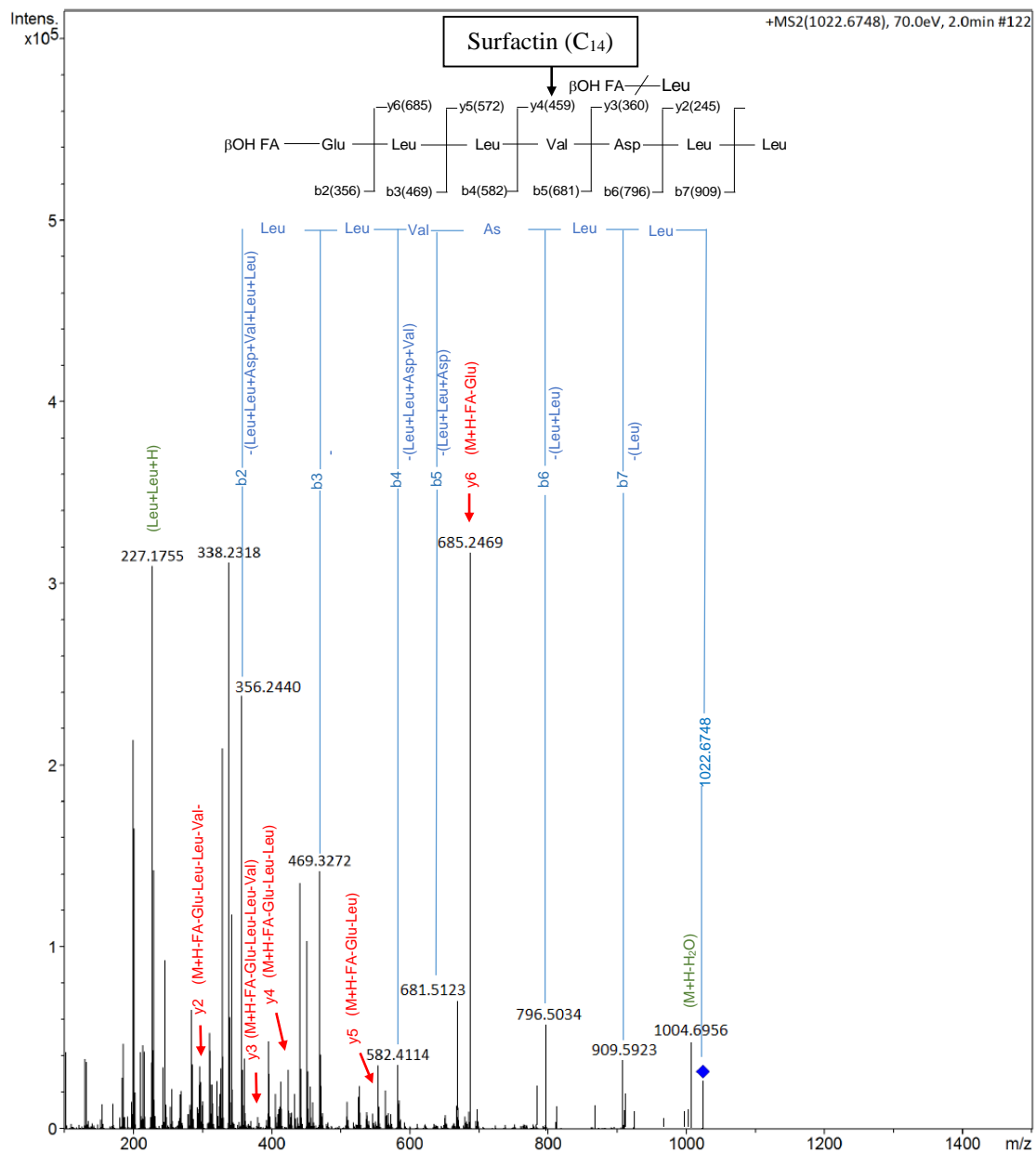


Figura 78. Espectro de fragmentação do íon ([M+H]⁺) em *m/z* 1022,6748, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Surfactina A3 de *B. amyloliquefaciens*, e respectiva proposta de fragmentação para a isoforma Surfactina A (C₁₄).

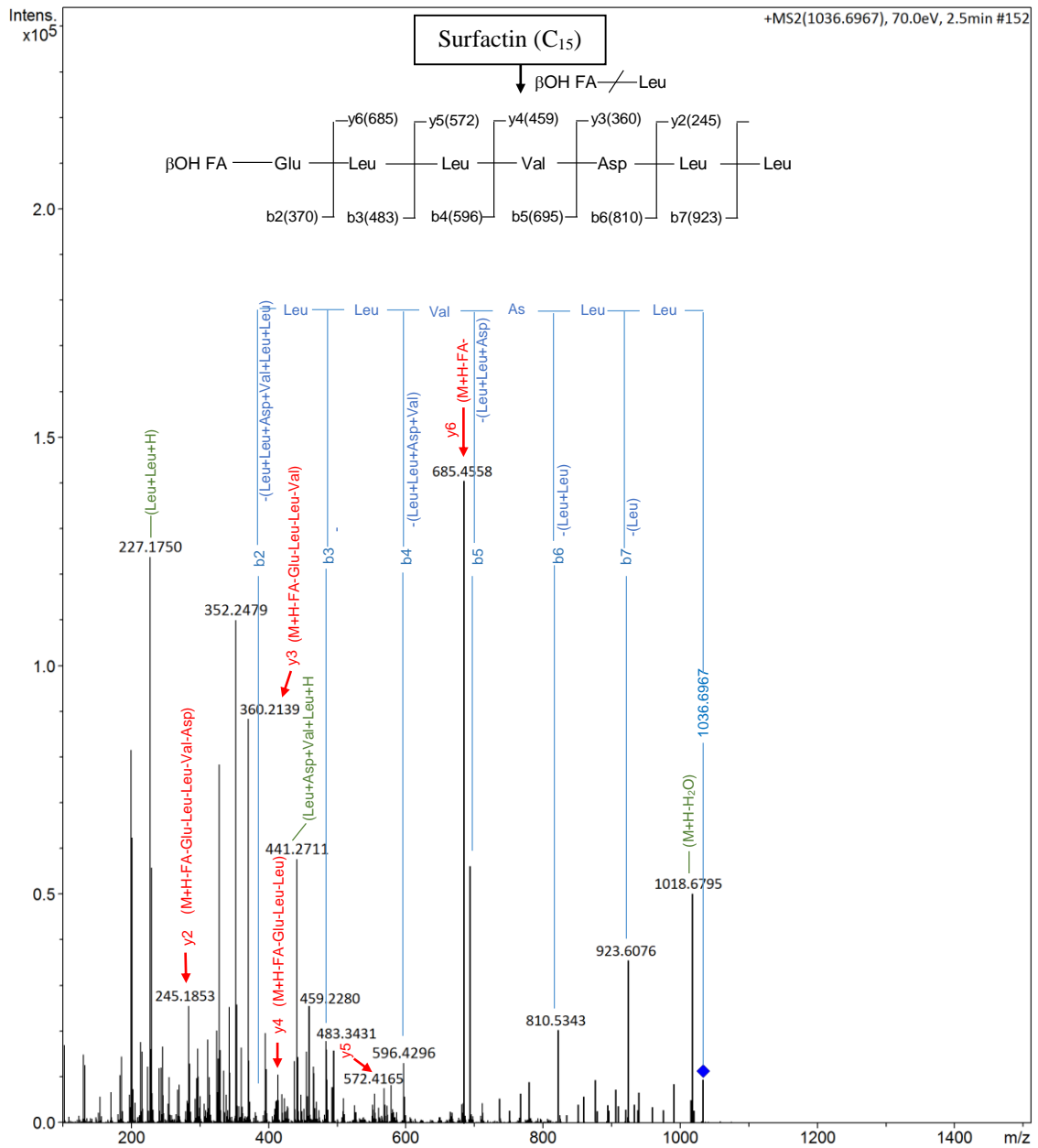


Figura 79. Espectro de fragmentação do íon ($[M+H]^+$) em m/z 1036,6967, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Surfactina A4 de *B. amyloliquefaciens*, e repectiva proposta de fragmentação para a isoforma Surfactina A (C₁₅).

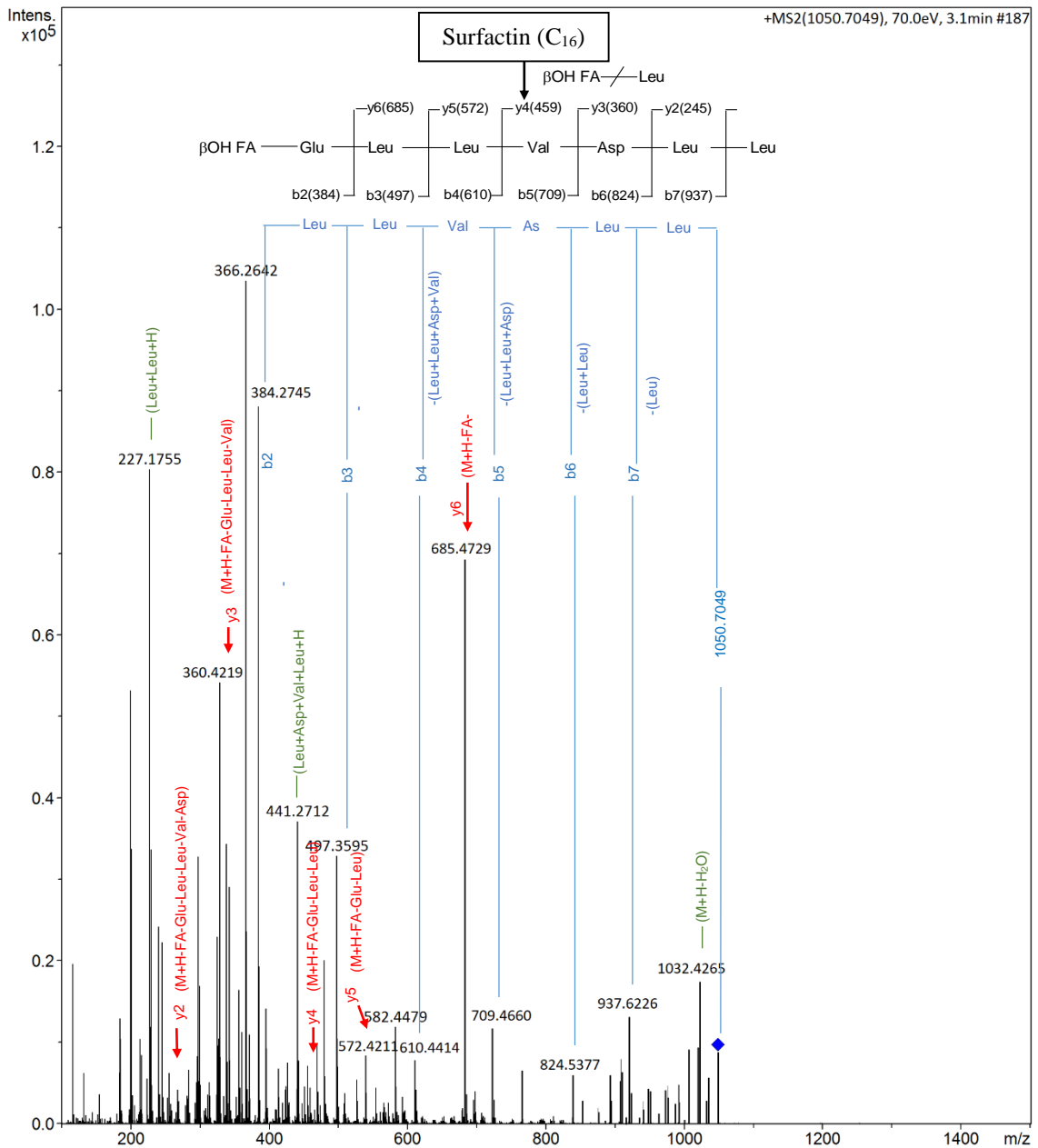
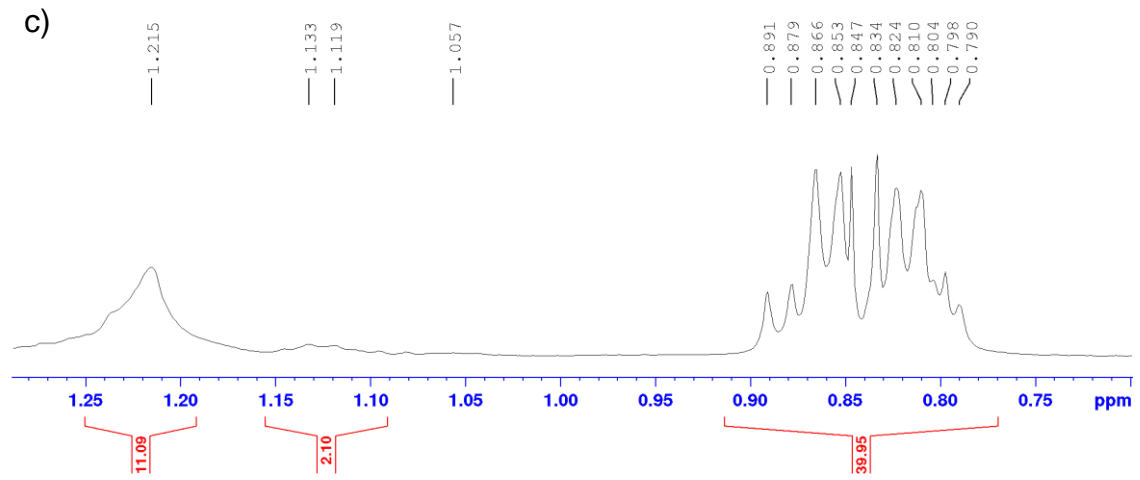
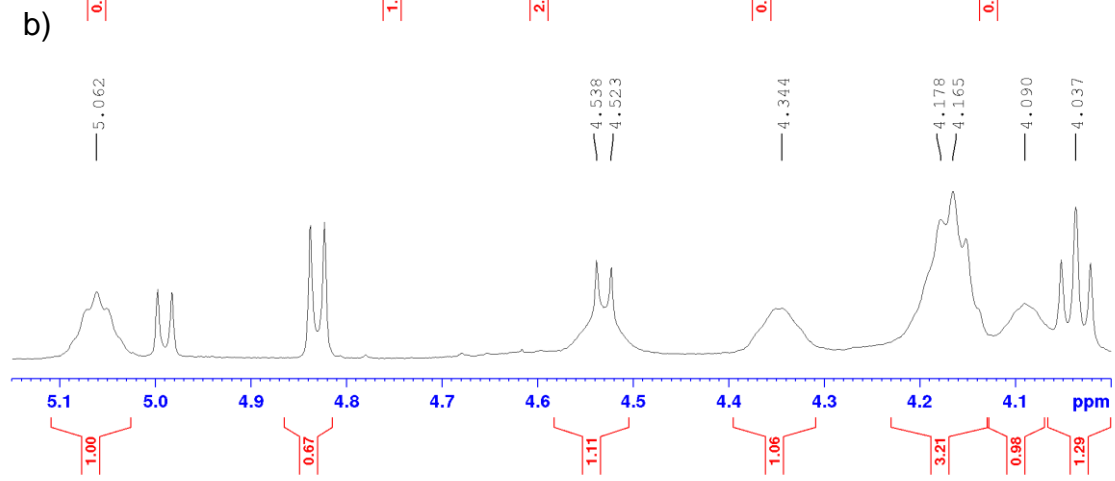
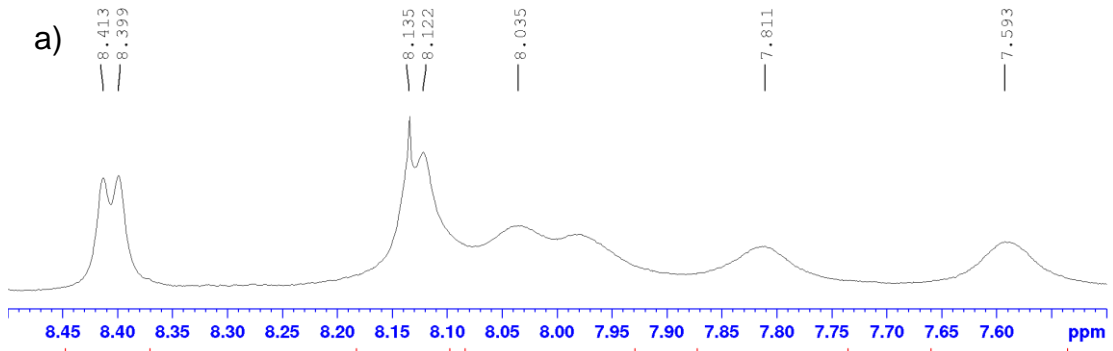


Figura 80. Espectro de fragmentação do íon ([M+H]⁺) em m/z 1050,7049, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Surfactina A5 de *B. amyloliquefaciens*, e respectiva proposta de fragmentação para a isoforma Surfactina A (C₁₆).



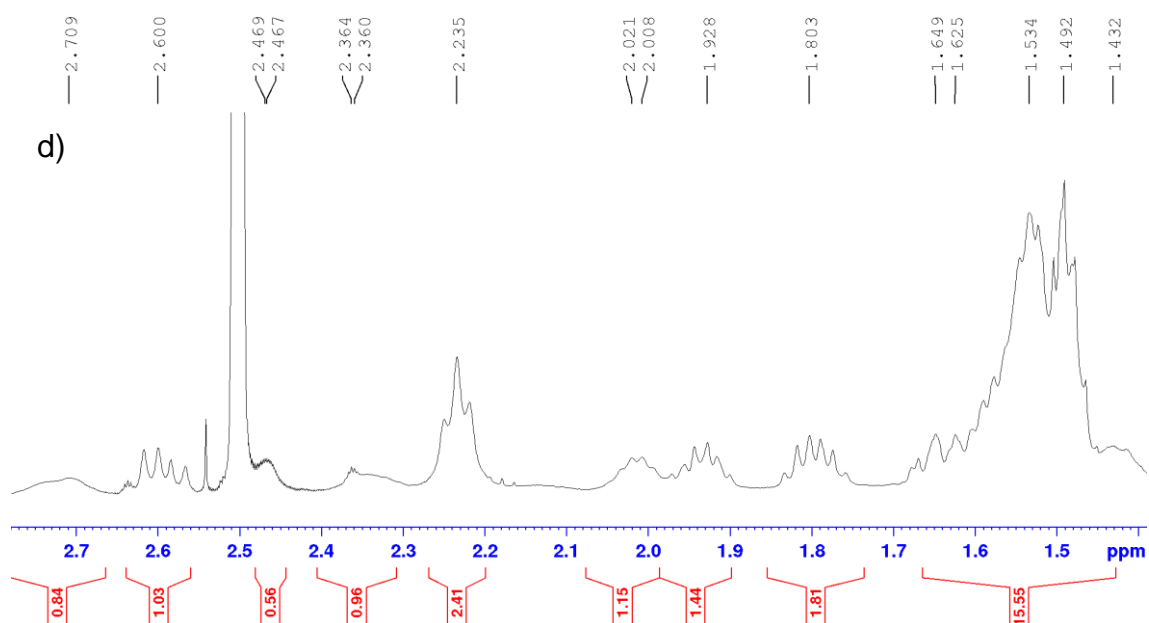


Figura 81. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Surfactina A1 em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N; b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos; c) hidrogênios metilênicos e metílicos; d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH_2 , β e γ).

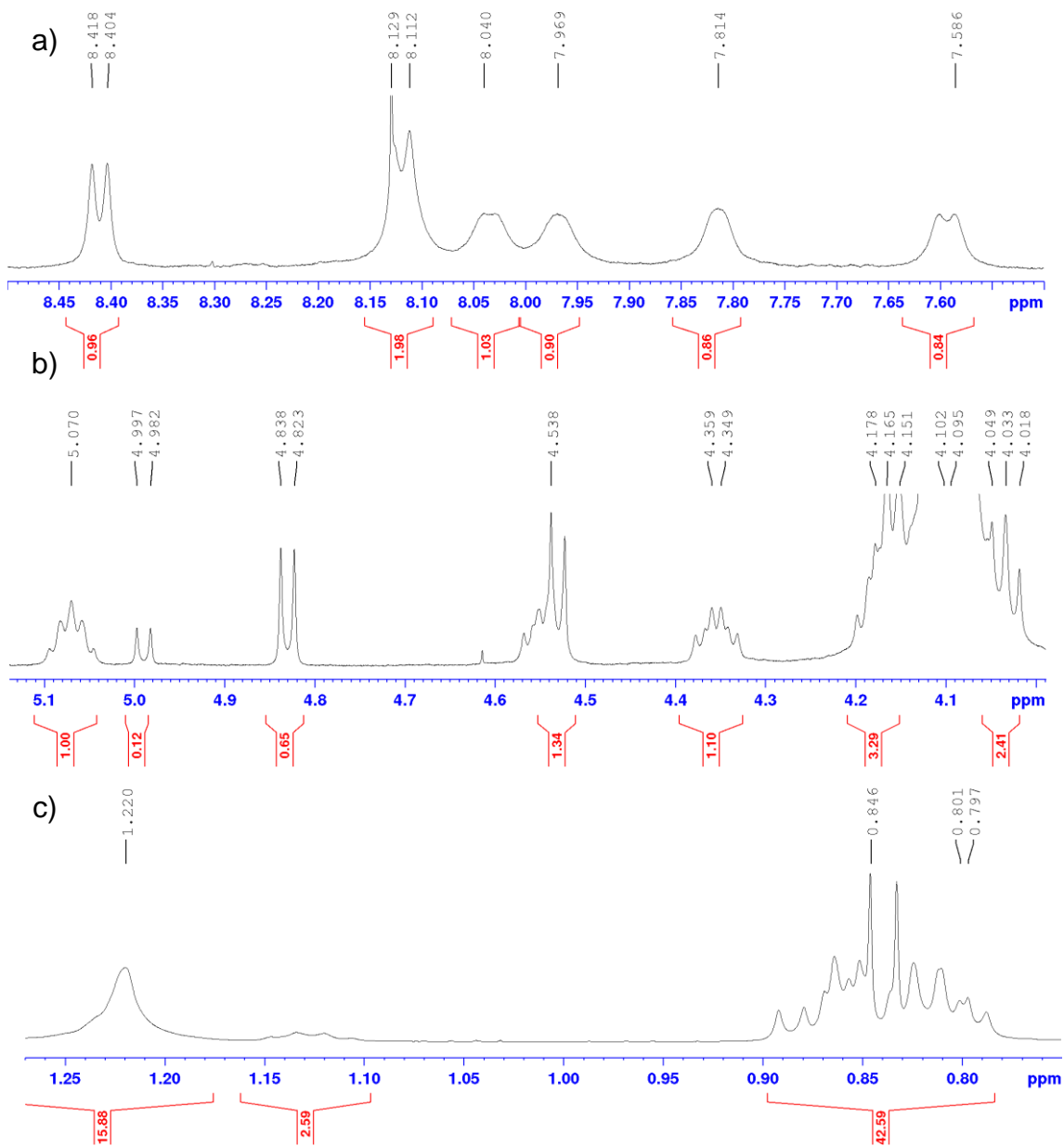
Tabela 31. Dados de RMN de ^1H e HMBC, da amostra Surfactina A1-Surfactina A (*iso-C*₁₃ e *anteiso-C*).

Aminoácido	Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HMBC ^a
Glu-1	α	4,166 (m, 1H)	4,21 (m)	27,7; 30,1; 170,8; 171,6
	β	1,79 (m, 1H)/	1,81 (m)/	30,1; 53,1; 171,6; 174,4
		1,92 (m, 1H)	1,94 (m)	30,1; 53,1; 171,6; 174,4
	γ	2,23 (m)	2,31 (m)	27,7; 53,1; 174,4
	δ	-	-	-
	NH	7,81 (s, 1H)	7,81 (d, 6,6)	-
	CO	-	-	-
Leu-2	α	4,15 (m, 1H)	4,19 (m)	24,7; 39,4; 173,1
	β	1,48 (m)	1,49 (m)	24,7; 39,4
	γ	1,50 (m)	1,49 (m)	24,7; 39,4
	δ_1	0,84 (m)	0,85 (m)	39,4
	δ_2	0,84 (m)	0,85 (m)	39,4

	NH	8,00 (s, 1H)	7,99 (d, 5,7)	-
	CO	-	-	-
Leu-3	α	4,17 (m,1H)	4,19 (m)	39,8; 173,2
	β	1,53 (m)	1,54 (m)	24,7; 52,3
	γ	1,59 (m)	1,54 (m)	39,8
	δ_1	0,85 (m)	0,80 (m)	24,7
	δ_2	0,85 (m)	0,87 (m)	24,7
	NH	8,12 (d, 6,45, 1H)	8,29 (d, 7,1)	-
	CO	-	-	-
Val-4	α	4,03 (t, 7,5)	4,09 (t, 8,3)	18,6; 19,1; 30,5; 171,5
	β	2,01 (m)	1,96 (m)	19,1; 59,0
	γ_1	0,78 (m)	0,75 (m)	59,0
	γ_2	0,85 (m)	0,85 (m)	18,6; 30,5; 59,0
	NH	8,03 (s, 1H)	7,74 (d, 8,3)	-
	CO	-	-	-
Asp-5	α	4,53 (m, 1H)	4,54 (m)	36,1; 170,3; 172,3
	β	2,71 (m)/	2,71 (dd, 5,1,	50,1; 172,3
		2,59 (m)	16,6)/	
			2,60 (dd,	
			8,8,16,6)	
		-	-	-
	NH	8,13 (d, 6,45)	8,15 (d, 7.4)	-
	CO	-	-	-
Leu-6	α	4,34 (m)	4,51 (m)	-
	β	1,49 (m)	1,44 (m)	23,3
		1,40 (m)		24,0
	γ	1,55 (m)	1,44 (m)	42,0
	δ_1	0,82 (m)	0,84 (m)	24,7; 42,0
	δ_2	0,83 (m)	0,84 (m)	42,0
	NH	7,60 (s, 1H)	7,62 (d, 8,5)	-
	CO	-	-	-
Leu-7	α	4,08 (m)	4,30 (m)	39,5; 172,1
	β	1,65 (m)	1,53 (m)	24,5; 51,2

	γ	1,54 (m)	1,37 (m)	39,5
	δ_1	0,85 (m)	0,81 (m)	24,5
	δ_2	0,85 (m)	0,81 (m)	24,5
	NH	8,41 (d, 7,28)	8,59 (d, 6.6)	172,1
	CO	-	-	-
Ácido graxo	1	-	-	-
	2	2,35 (m)/ 2,46 (m)	2,50 (m)/ 2,34(m)	34,0; 170,8/ 71,9; 170,8
	3	5,05 (m)	5,07 (m)	24,7; 34,0; 41,7; 170,8; 172,1
	4	1,53 (m)	1,54 (m)	24,7; 29,0
	5	1,22 (s)	1,22 (m)	29,1; 34,0
	6-9 ^c	1,22 (s)	1,21 (m)	29,2- 29,3
	10 ^c	1,18 (m)	1,21 (m)	29,3
	11 ^c	1,10 (m)	1,21 (m)	22,9
	12 ^c	0,84 (m)	0,83 (m)	22,9; 27,6
	13 ^c	0,84 (m)	0,83 (m)	22,9; 27,6
	6-8 ^d	1,22 (s)	1,21 (m)	29,0
	9 ^d	1,22 (1H, m)	1,21 (m)	29,1
	10 ^d	1,10 (m)	1,13 (m)	29,3
	11 ^d	1,09 (m)	1,11 (m)	11,6; 19,5; 34,3; 36,5
	12 ^d	0,81 (m)	0,84 (m)	29,3
	13 ^d	0,82 (m)	0,85(m)	34,3; 36,5

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ¹H e 125 MHz ¹³C com DMSO-*d*₆, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da surfactina A (*iso* e *anteiso* C₁₃) (TANG et al. 2007; ¹H; 400 MHz, ¹³C 100 MHz, DMSO-*d*₆). ^cDados da surfactina A (*iso* -C₁₃). ^dDados da surfactina A (*anteiso* -C₁₃) (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.



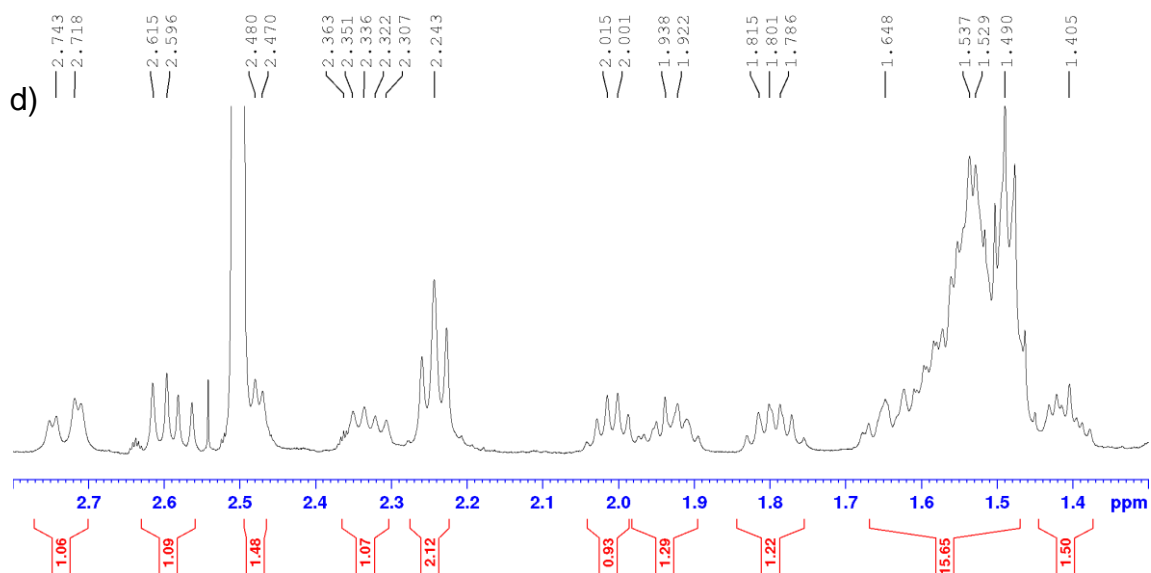


Figura 82. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Surfactina A3 em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N; b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos; c) hidrogênios metilênicos e metílicos; d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH_2 , β e γ).

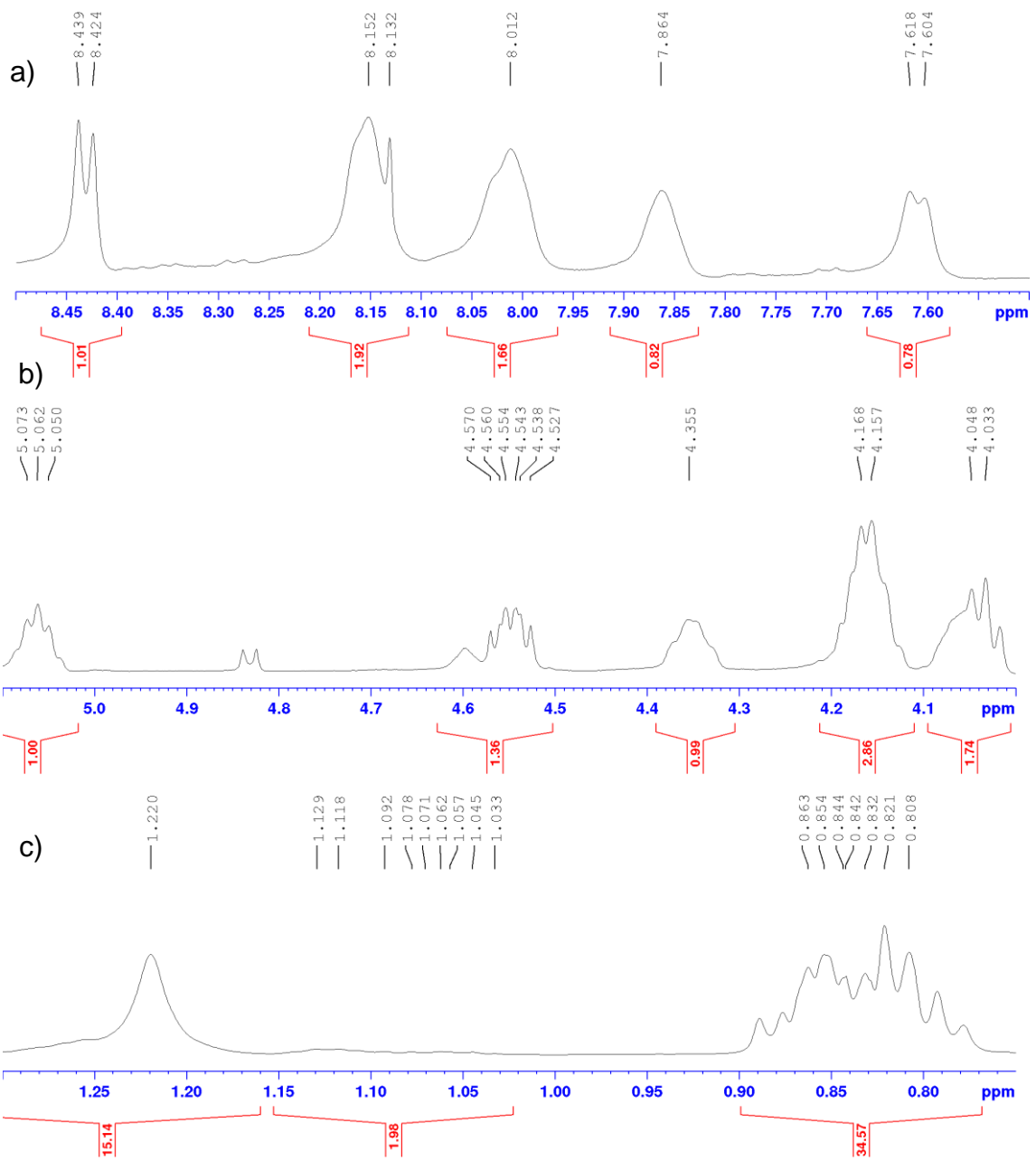
Tabela 32. Dados de RMN de ^1H e HMBC, da amostra Surfactina A3-Surfactina A (*iso-C*₁₄).

Aminoácido	Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HMBC ^a
Glu-1	α	4,16 (m, 1H)	4,21 (m)	27,7; 30,1; 171,7
	β	1,80 (m, 1H)/	1,81 (m)/	30,1; 53,0; 171,7; 174,4
		1,92 (m, 1H)	1,94 (m)	30,1; 53,0; 171,7; 174,4
	γ	2,24 (m)	2,31 (m)	27,7; 53,0; 174,4
	δ	-	-	-
	NH	7,81 (s, 1H)	7,81 (d, 6,6)	-
CO	-	-	-	
Leu-2	α	4,15 (m, 1H)	4,19 (m)	39,3; 171,7
	β	1,48 (m)	1,49 (m)	24,7; 39,3
	γ	1,50 (m)	1,49 (m)	24,7; 39,3
	δ_1	0,84 (m)	0,85 (m)	39,3
	δ_2	0,84 (m)	0,85 (m)	39,3
	NH	7,96 (s, 1H)	7,99 (d, 5,7)	-

	CO	-	-	-
Leu-3	α	4,17 (m, 1H)	4,19 (m)	24,7; 39,8; 173,3
	β	1,53 (m)	1,54 (m)	24,7; 52,3
	γ	1,59 (m)	1,54 (m)	39,8
	δ_1	0,85 (m)	0,80 (m)	24,7
	δ_2	0,85 (m)	0,87 (m)	24,7
	NH	8,11 (m, 1H)	8,29 (d, 7,1)	-
	CO	-	-	-
Val-4	α	4,01 (t, 7,5)	4,09 (t, 8,3)	18,4; 19,4; 30,6; 171,5
	β	2,01 (m)	1,96 (m)	18,4; 19,4; 59,0
	γ_1	0,79 (m)	0,75 (m)	19,5; 30,6; 59,0
	γ_2	0,85 (m)	0,85 (m)	18,4; 30,6; 59,0
	NH	8,04 (s, 1H)	7,74 (d, 8,3)	-
		CO	-	-
Asp-5	α	4,53 (m, 1H)	4,54 (m)	36,1; 170,5; 172,3
	β	2,73 (m)/	2,71 (dd, 5,1, 16,6)/	50,1; 172,3
		2,59 (m)	2,60 (dd, 8,8, 16,6)	50,1
	γ	-	-	-
	NH	8,12 (d, 6,45)	8,15 (d, 7,4)	-
		CO	-	-
Leu-6	α	4,35 (m)	4,51 (m)	172,1
	β	1,49 (m)	1,44 (m)	23,0; 38,5
		1,40 (m)		23,3
	γ	1,55 (m)	1,44 (m)	42,0
	δ_1	0,80 (m)	0,84 (m)	24,7; 42,0
	δ_2	0,83 (m)	0,84 (m)	42,0
	NH	7,58 (s, 1H)	7,62 (d, 8,5)	-
	CO	-	-	-
Leu-7	α	4,04 (m)	4,30 (m)	39,5; 171,2
	β	1,65 (m)	1,53 (m)	24,3; 51,2
	γ	1,54 (m)	1,37 (m)	39,5
	δ_1	0,85 (m)	0,81 (m)	24,3
	δ_2	0,85 (m)	0,81 (m)	24,3

Ácido graxo	NH	8,42 (d, 7,3)	8,59 (d, 6.6)	51,2; 172,2
	CO	-	-	-
	1	-	-	-
	2	2,33 (m)/ 2,47 (m)	2,50 (m)/ 2,34(m)	34,0; 170,4/ 71,9; 170,4
	3	5,05 (m)	5,07 (m)	24,7; 34,0; 41,7; 170,4; 172,2
	4	1,53 (m)	1,54 (m)	24,7; 29,0; 41,7
	5	1,21 (s)	1,22 (m)	29,1; 34,0
	6-9	1,21 (s)	1,21 (m)	29,2- 29,6
	10	1,22 (s)	1,21 (m)	38,8
	11	1,23 (s)	1,28 (m)	22,9; 29,3
	12	1,13 (m)	1,21 (m)	22,9
	13 e 14	0,84 (m)	0,83 (m)	22,9; 27,8; 38,9

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ¹H e 125 MHz ¹³C com DMSO-*d*₆, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da surfactina A (*iso*-C₁₄). (TANG et al. 2007; ¹H; 400 MHz, ¹³C 100 MHz, DMSO-*d*₆). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.



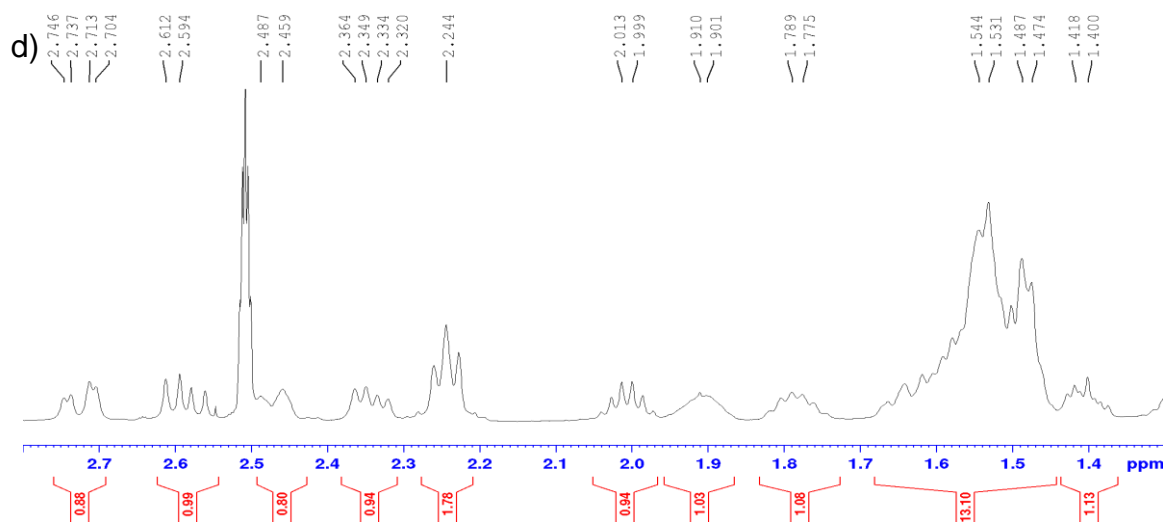


Figura 83. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Surfactina A4 em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N; b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos; c) hidrogênios metilênicos e metílicos; d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH_2 , β e γ).

Tabela 33. Dados de RMN de ^1H e HMBC, da amostra Surfactina A4-Surfactina A (*iso-C*₁₅ e *anteiso-C*₁₅).

Aminoácido	Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HMBC ^a
Glu-1	α	4,166 (m, 1H)	4,21 (m)	27,7; 30,1; 171,5
	β	1,78 (m, 1H)/	1,81 (m)/	30,1; 53,0; 171,5; 174,4
		1,90 (m, 1H)	1,94 (m)	30,1; 53,0; 171,5; 174,4
	γ	2,24 (m)	2,31 (m)	27,7; 53,0; 174,4
	δ	-	-	-
	NH	7,86 (s, 1H)	7,81 (d, 6,6)	170,4
CO	-	-	-	
Leu-2	α	4,15 (m, 1H)	4,19 (m)	24,7; 171,6
	β	1,48 (m)	1,49 (m)	23,0; 24,7; 39,4
	γ	1,50 (m)	1,49 (m)	22,6; 39,4
	δ_1	0,85 (m)	0,85 (m)	39,4
	δ_2	0,85 (m)	0,85 (m)	39,4
	NH	8,00 (s, 1H)	7,99 (d, 5,7)	171,5

	CO	-	-	-
Leu-3	α	4,17 (m, 1H)	4,19 (m)	39,8; 173,2
	β	1,53 (m)	1,54 (m)	24,7; 52,3
	γ	1,59 (m)	1,54 (m)	39,8
	δ_1	0,87 (m)	0,80 (m)	24,7
	δ_2	0,88 (m)	0,87 (m)	24,7
	NH	8,12 (d, 6,45, 1H)	8,29 (d, 7,1)	173,2
	CO	-	-	-
Val-4	α	4,03 (t, 7,5)	4,09 (t, 8,3)	18,4; 19,4; 30,5; 171,3
	β	2,01 (m)	1,96 (m)	19,4; 59,0; 171,3
	γ_1	0,78 (m)	0,75 (m)	19,4; 30,6; 59,0
	γ_2	0,85 (m)	0,85 (m)	18,4; 30,6; 59,0
	NH	8,03 (s, 1H)	7,74 (d, 8,3)	-
		CO	-	-
Asp-5	α	4,53 (m, 1H)	4,54 (m)	36,1; 170,4; 172,0
	β	2,73 (dd, 4,6; 12,5)/	2,71 (dd, 5,1, 16,6)/	50,1; 170,4; 172,0
		2,59 (dd, 9,0; 16,9)	2,60 (dd, 8,8,16,6)	50,1; 170,4; 172,0
		-	-	-
	NH	8,13 (d, 6,45)	8,15 (d, 7,4)	-
		CO	-	-
Leu-6	α	4,34 (m)	4,51 (m)	42,0; 172,1
	β	1,49 (m)	1,44 (m)	23,0; 24,7
		1,40 (m)		23,8
	γ	1,54 (m)	1,44 (m)	42,0
	δ_1	0,82 (m)	0,84 (m)	24,7; 42,0
	δ_2	0,83 (m)	0,84 (m)	42,0
	NH	7,60 (s, 1H)	7,62 (d, 8,5)	170,3
	CO	-	-	-
Leu-7	α	4,05 (m)	4,30 (m)	172,2
	β	1,65 (m)	1,53 (m)	24,5; 51,2
	γ	1,54 (m)	1,37 (m)	24,5

	δ_1	0,85 (m)	0,81 (m)	24,5
	δ_2	0,85 (m)	0,81 (m)	24,5
	NH	8,43 (d, 7,28)	8,58 (d, 6.3)	51,2; 172,2
	CO	-	-	-
Ácido graxo	1	-	-	-
	2	2,34 (m)/ 2,45 (m)	2,50 (m)/ 2,34(m)	34,0; 71,9; 170,4/ 34,0; 71,9; 170,4
	3	5,05 (m)	5,07 (m)	24,7; 34,0; 41,7; 170,4; 172,2
	4	1,53 (m)	1,54 (m)	24,7; 29,0
	5	1,28 (s)	1,22 (m)	29,1; 34,0
	6-8 ^c	1,22 (s)	1,21 (m)	29,0- 29,2
	9 ^c	1,22 (m)	1,21 (m)	29,0- 29,2
	10 ^c	1,22 (m)	1,21 (m)	29,0- 29,2
	11 ^c	1,23 (m)	1,27 (m)	29,2
	12 ^c	1,10 (m)	1,13 (m)	19,5; 36,0
	13 ^c	1,09 (m)	1,11 (m)	11,5; 19,5; 34,4
	14 ^c	0,83 (m)	0,83 (m)	27,8
	15 ^c	0,84 (m)	0,83 (m)	34,4
	6-10 ^d	1,21 (s)	1,21 (m)	29,2- 29,6
	11 ^d	1,22 (s)	1,21 (m)	29,6
	12 ^d	1,23 (s)	1,28 (m)	38,9
	13 ^d	1,13 (m)	1,21 (m)	22,9
	14 ^d e 15 ^d	0,84 (m)	0,84 (m)	22,9; 27,8; 38,9

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ¹H e 125 MHz ¹³C com DMSO-*d*₆, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da surfactina A (*iso* e *anteiso* C₁₅) (TANG et al. 2007; ¹H; 400 MHz, ¹³C 100 MHz, DMSO-*d*₆). ^cDados da surfactina A (*anteiso* -C₁₅). ^dDados da surfactina A (*iso* -C₁₅) (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

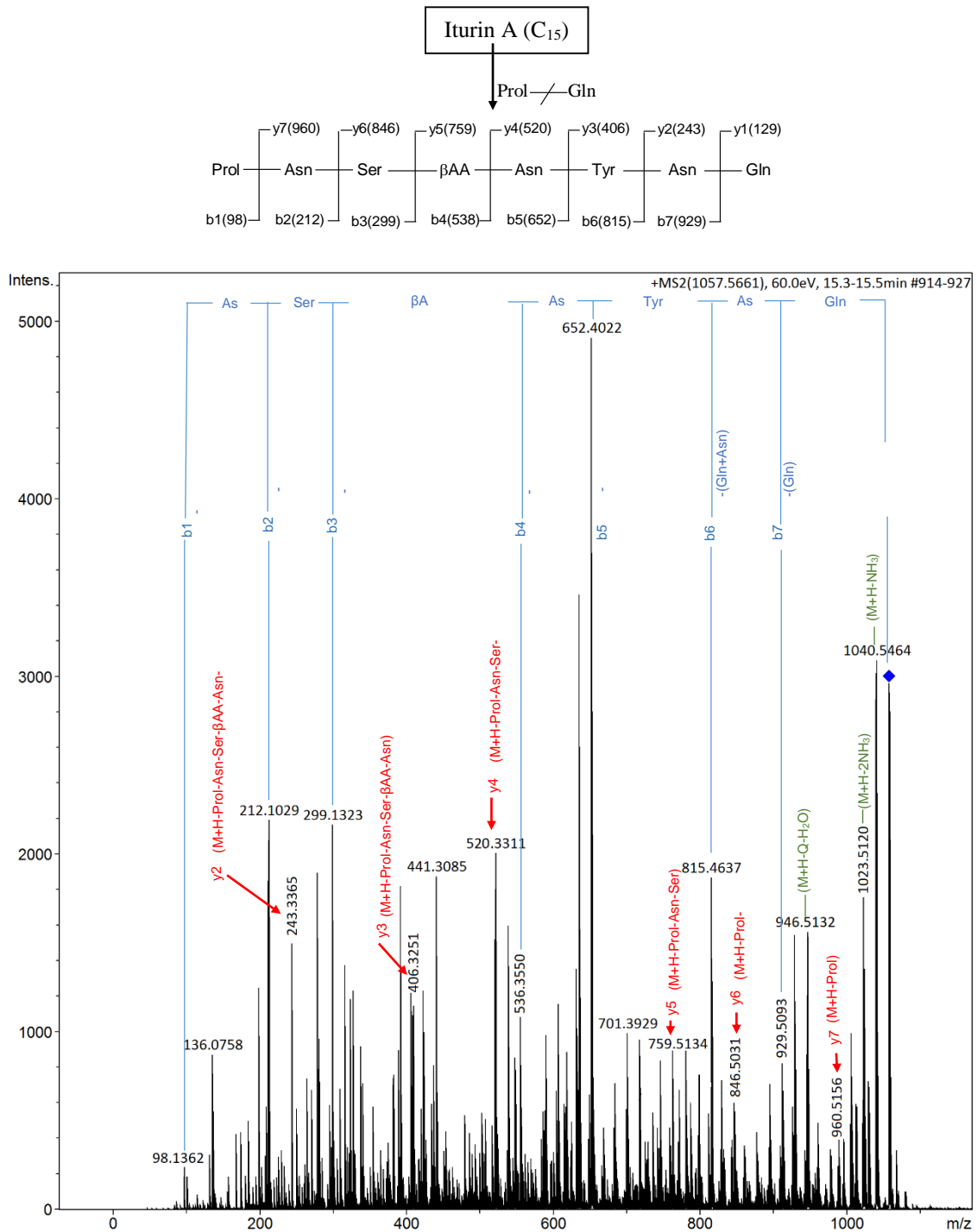


Figura 84. Espectro de fragmentação do íon ([M+H]⁺) em m/z 1057,5661, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Iturina A2 de *B. amyloliquefaciens*, e respectiva proposta de fragmentação para a isoforma iturina A (C₁₅).

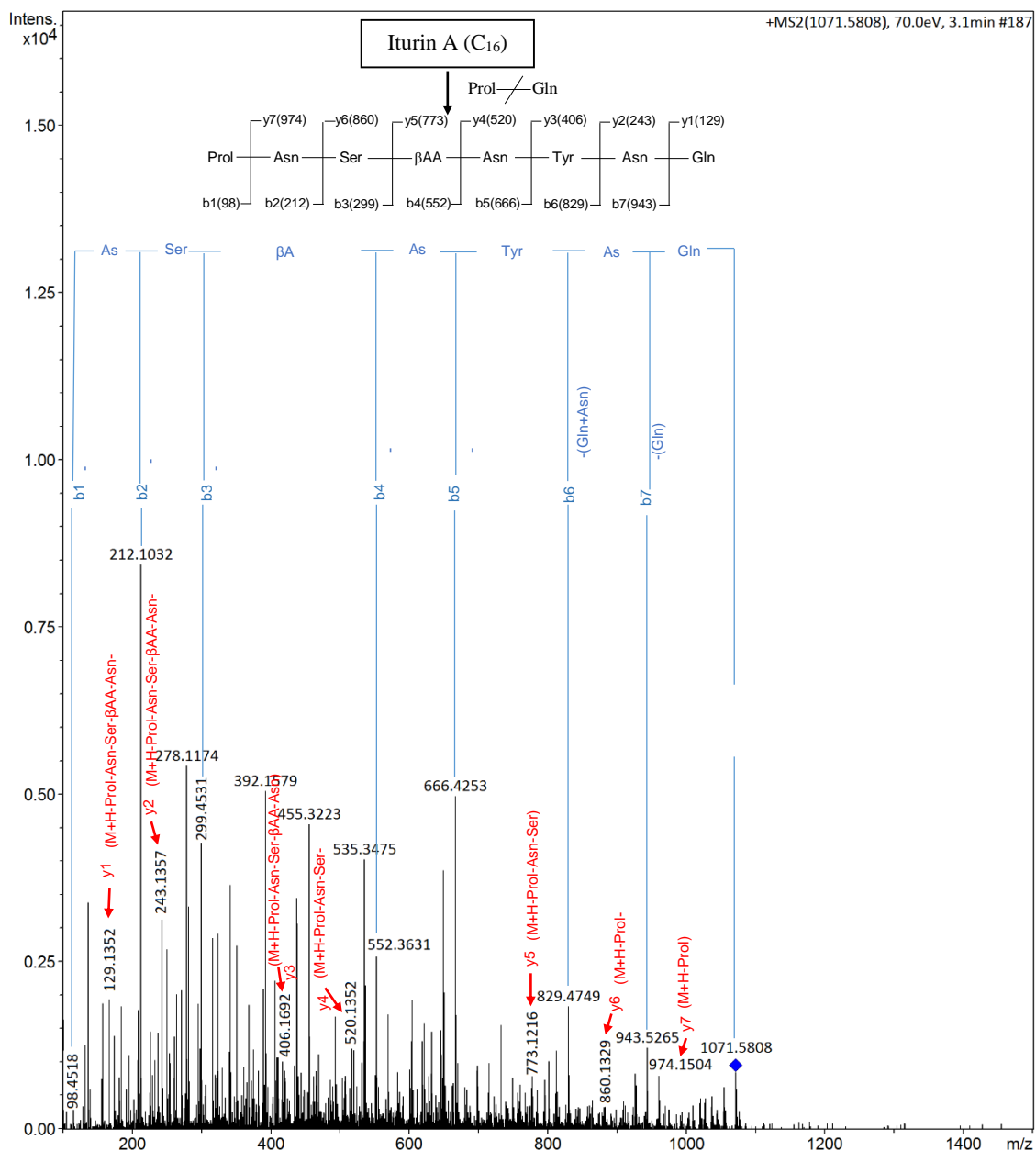


Figura 85. Espectro de fragmentação do íon $([M+H]^+)$ em m/z 1071,5808, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Iturina A3 de *B. amyloliquefaciens*, e respectiva proposta de fragmentação para a isoforma iturina A (C₁₆).

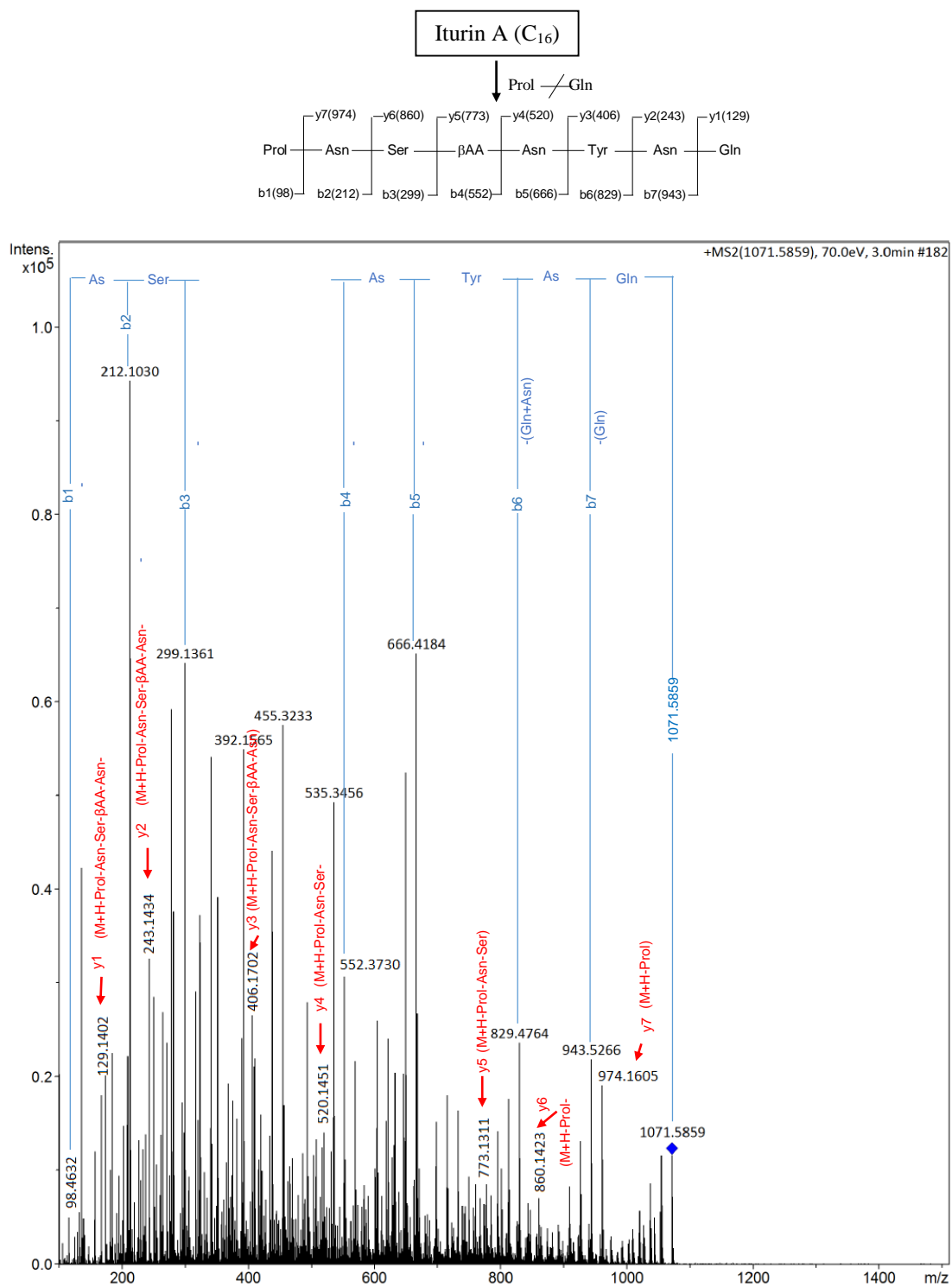


Figura 86. Espectro de fragmentação do íon([M+H]⁺) em m/z 1071,5859, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Iturina A4 de *B. amyloliquefaciens*, e respectiva proposta de fragmentação para a isoforma iturina A (C₁₆).

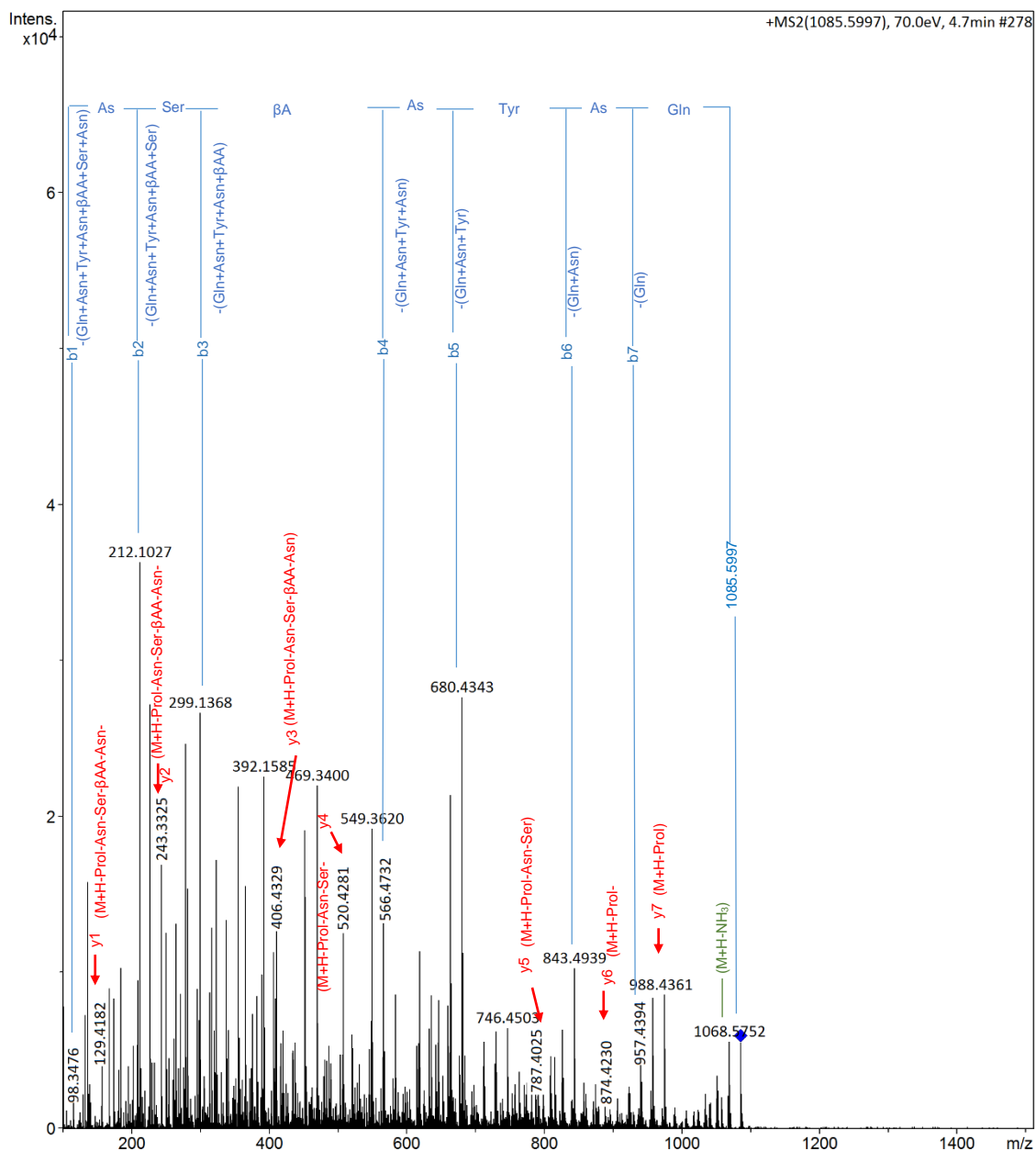
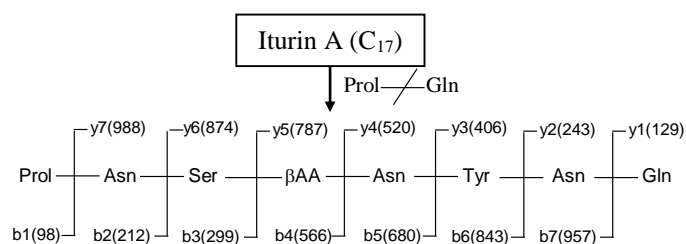
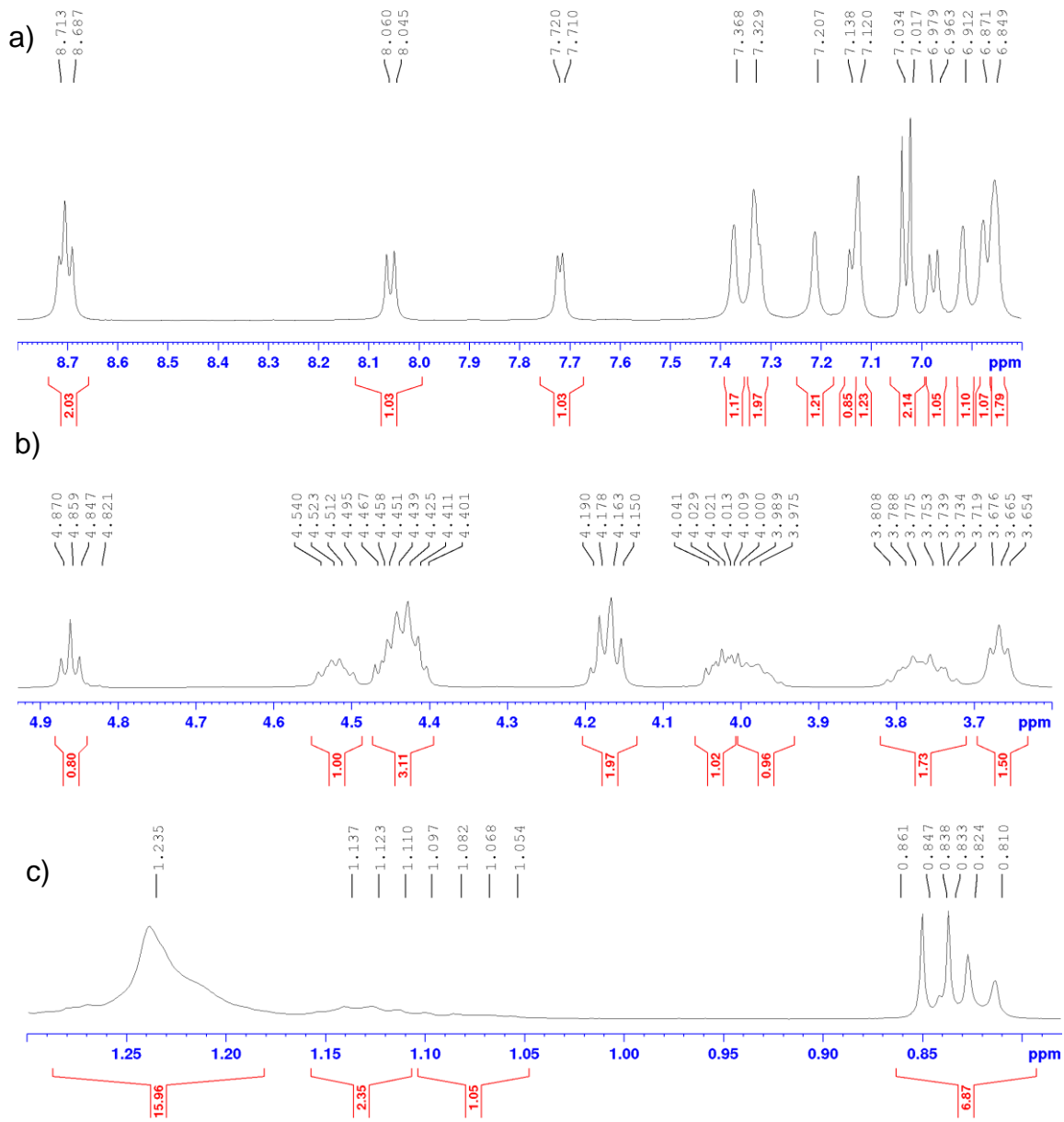


Figura 87. Espectro de fragmentação do íon $([M+H]^+)$ em m/z 1085,5997, obtido por LC-ESI-MS/MS da amostra Iturina A5 de *B. amyloliquefaciens*, e respectiva proposta de fragmentação para a isoforma iturina A (C₁₇).



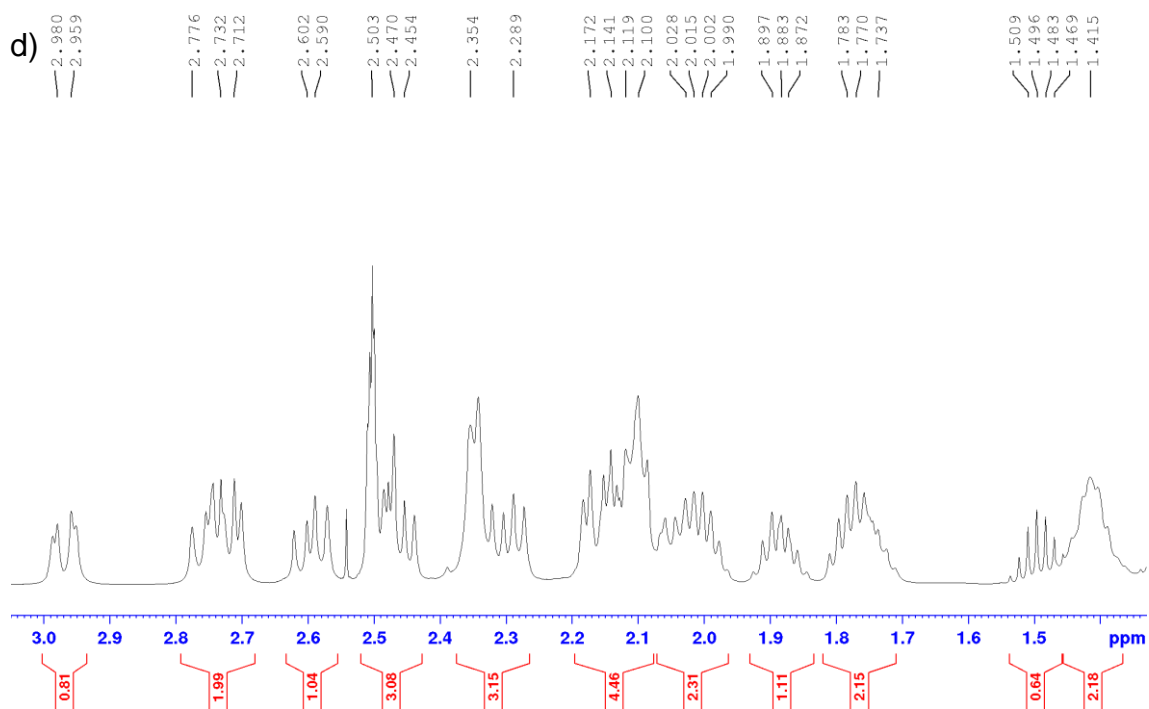


Figura 88. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Iturina A2 em DMSO- d_6 (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N e aromáticos; b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos; c) hidrogênios metilênicos e metílicos; d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH_2 , β e γ).

Tabela 34. Dados de RMNN de ^1H e HMBC, da amostra Iturina A2.

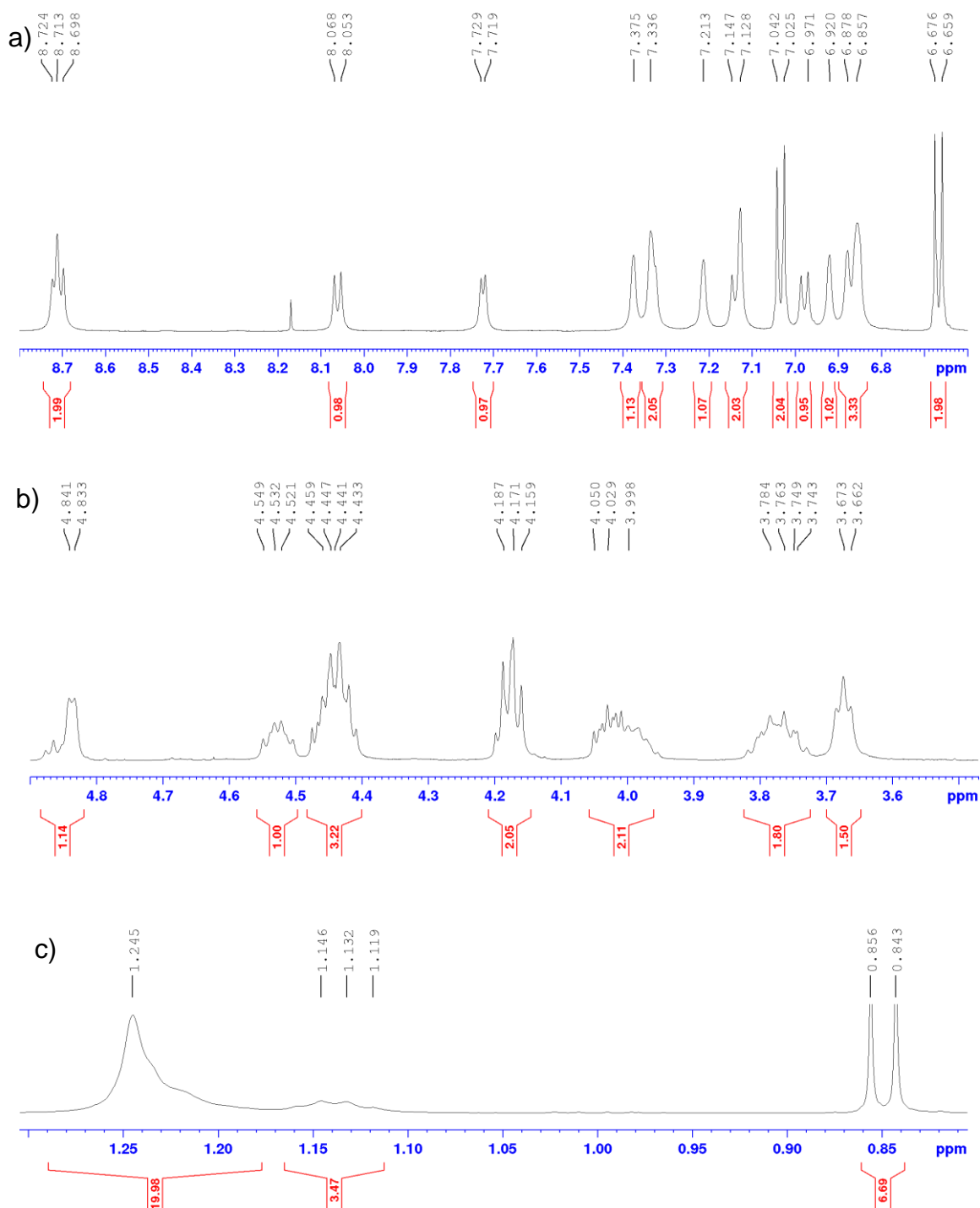
Amino ácido	Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^a
Asn ¹	H- α	4,43 (2H, m)	4,42 (2H, m)	173,8
	H- β	2,29 (1H, dd, 15,8 e 8,4)/	2,29 (1H, dd, 15,8, 8,4)/	51,2; 171,2
		2,17 (1H, m)	2,16 (1H, dd)	51,2; 171,2
	CO	-	-	-
	CO	-	-	-
NH	NH	7,71 (1H, s)	7,70 (1H, d)	36,7; 51,2; 171,6
		NH ₂	7,32 (1H, s)/	7,31 (1H, s)
		6,91 (1 H, s)	6,89 (1H, s)	36,7; 171,2
Tyr ²	H- α	4,03 (1H, m)	4,02 (1H, m)	35,4; 42,2; 61,2; 128,5; 171,7

	H- β	2,96 (1H, dd, 14,4 e 3,9)/ 2,73 (1H, m)	2,96 (1H, dd, 14,3 e 3,7)/ 2,73 (1H, m)	56,8; 128,4; 130,2; 171,7 56,8; 130,2; 128,4;172,2
	C- γ	-	-	-
	H- δ e H- θ	7,02 (2H, d, 8,4)	7,01 (2H, d, 8,4)	174,5
	H- ε e H- η	6,66 (2H, d, 8,4)	6,65 (2H, d, 8,4)	128,4; 115,5; 156,1
	CO	-	-	-
	NH	8,71 (2H, t)	8,68 (2H, d)	35,4; 56,8; 173,8
	OH- ζ	9,17 (1H, s)	-	
Asn³	H- α	4,44 (1H, m)	4,43 (1H, m)	36,5; 171,5
	H- β	2,59 (1H, dd, 15,4 e 9,4)/ 2,50 (1H, m)	2,58 (1 H, dd, 15,4 e 9,5)/ 2,47 (1H, dd)	171,5 50,16; 171,5
	CO			
	CO			
	NH	8,05 (1H, d, 7,6)	8,04 (1H, d, 7,2)	36,5; 51,16; 171,7
	NH ₂	7,20 (1H, s)	7,19 (1H, s)	171,5
		6,87 (1H, s)	6,85 (1H, s)	171,5
Gln⁴	H- α	4,51 (1H, m)	4,51 (1H, m)	27,0
	H- β	2,02 (1H, m)	2,03 (1H, m)	
		1,74 (1H, m)	1,75 (1H, m)	50,1
	H- γ	2,09 (2H, m)	2,09 (2H, m)	1,74; 4,51; 6,97
	CO			
	CO			
	NH	6,97 (1H, d, 7,8)	6,91 (1H, d)	27,0; 50,1; 171,4
	NH ₂	7,12 (1H, s)	7,10 (1H, s)	174,5
		6,85 (2H, s)	6,82 (2H, s)	31,0; 174,5
Prol⁵	H- α	4,17 (2H, m)	4,16 (2H, m)	25,0; 29,2; 47,6; 173,2
	H- β	2,13 (1H,m)/	2,12 (1H, m)	61,2

		1,76 (1H, m)	1,74 (1H, m)	61,2; 173,2
	H- γ	1,98 (1H,m)/	1,98 (1H, m)	47,6; 61,2
		1,88 (1H, m)	1,88 (1H, m)	47,6; 61,2
	H- δ	3,76 (2H, m)	3,75 (2H, m)	25,0; 29,5
	CO			
Asn⁶	H- α	4,43 (2H, m)	4,42 (2H, m)	
	H- β	2,71 (1H, m)/	2,71 (1H, dd)	172,3
		2,45 (1H, m)	2,45 (1H, dd)	51,2; 172,3
	CO			
	CO			
	NH	8,70 (2H,t)	8,68 (2H,d)	35,6; 51,2; 173,2
	NH ₂	7,36 (1H, s)/	7,35 (1H,s)	172,3
		6,85 (2H,s)	6,82 (2H,s)	35,6; 172,3
Ser⁷	H- α	4,17 (2H, m)	4,16 (2H, m)	61,8; 170,7
	H- β	3,66 (2H, t)	3,66 (2H,d)	56,6; 170,7
	CO			
	NH	7,32 (2H, m)	7,32 (1H, d)	56,6; 171,7
	OH- β	4,86 (1H, s)	4,83 (1H, br)	56,6; 61,8
Ácido graxo	1-CO	-	-	-
	2	2,34 (2H, m)	2,33 (2H, m)	171,6
	3	3,99 (1H,m)	3,97 (1H, m)	
	4	1,41 (2H, m)	1,40 (2H, m)	29,0
	5	1,25 (1H, m)/	1,28 (1H, m)	29,0
		1,13 (1H, m)	1,16 (1H, m)	29,0
	6-10 ^c	1,23 (br, s)	1,32-1,02	29,2-29,6
	11 ^c	1,28 (1H, m)	1,29 (1H, m)	29,6; 34,2
	12 ^c	1,29 (1H, m)	1,29 (1H, m)	11,6; 19,5
	13 ^c	1,09 (1H, m)	-	11,6; 19,5; 34,2; 36,4
	14 ^c	0,81 (3H, 7,2 t)	0,82 (3H, t, 7,3)	34,2; 36,5
	15 ^c	0,82 (3H, d, 6,8)	0,81 (3H, d, 7,3)	29,3
	6-10 ^d	1,23 (s)	1,25-1,10	29,2-29,6

11 ^d	1,24 (s)	1,25	38,9
12 ^d	1,14 (m)	1,10	22,9; 27,8
13 ^d	1,49 (1H, m)	1,49 (1H, m)	22,9; 38,9
14, 15 ^d	0,84 (6H, d, 6,5)	0,83 (6H, d, 6,6)	22,9; 27,8
3-NH	7,14 (1H, d, 8,4)	7,12 (1H, d)	170,7

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ¹H e 125 MHz ¹³C com DMSO-*d*₆, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com HIRADATE et al., 2002 (H; 600 MHz, DMSO-*d*₆). ^cDados para isoforma *anteiso*-C15. ^dDados para isoforma *iso*-C15. (δ) Deslocamento químico em ppm, (-) não identificado.



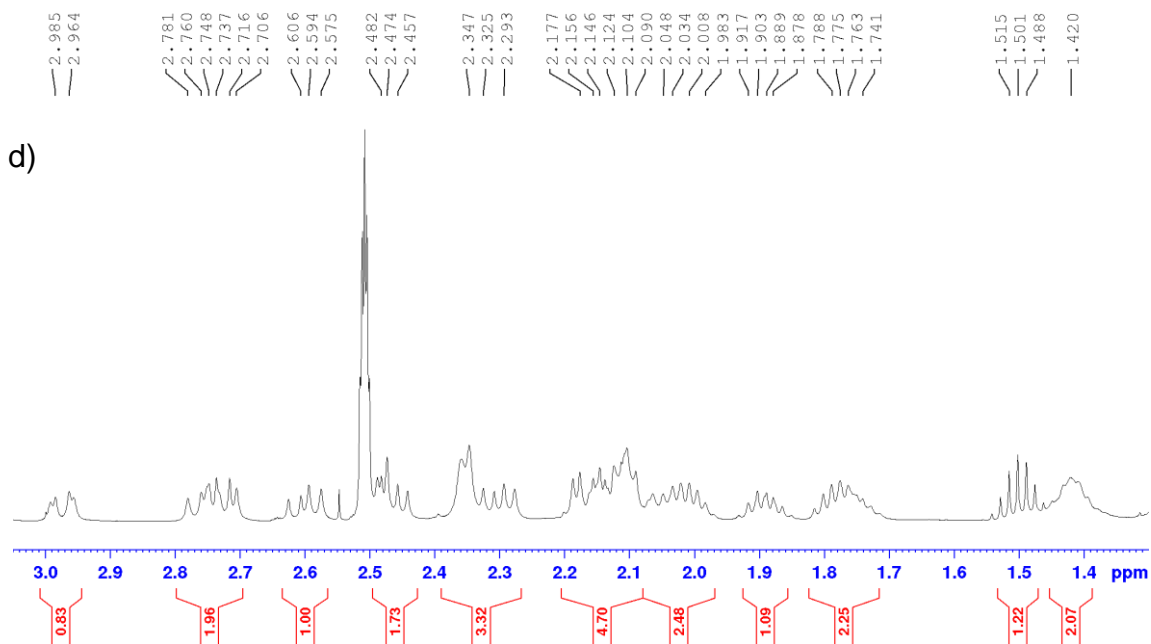


Figura 89. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Iturina A3 em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N e aromáticos; b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos; c) hidrogênios metilênicos e metílicos; d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH_2 , β e γ).

Tabela 35. Dados de RMNN de ^1H e HMBC, da amostra Iturina A3.

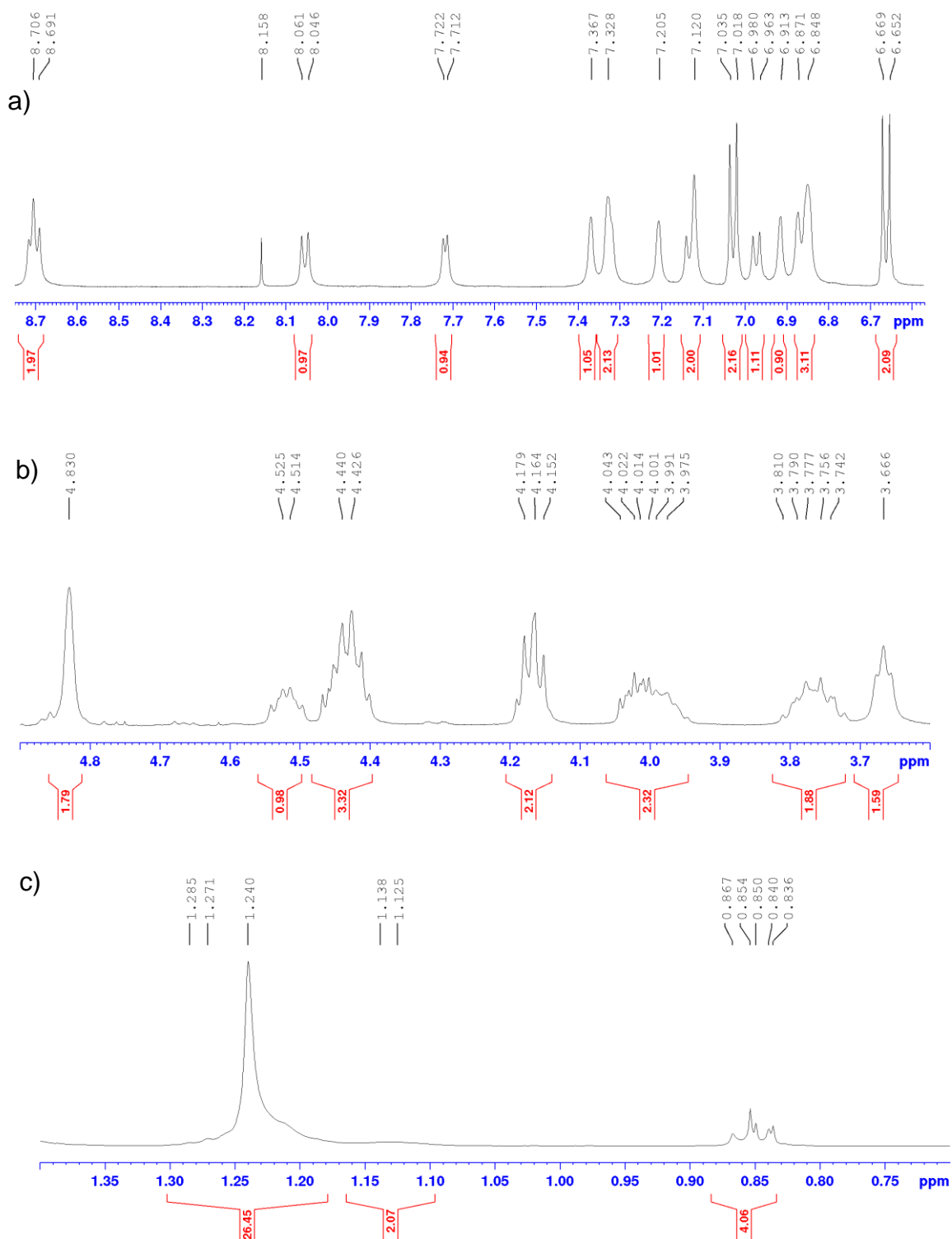
Amino ácido	Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^a
Asn ¹	H- α	4,43 (2H, m)	4,42 (2H, m)	173,8
	H- β	2,29 (1H, dd, 15,6 e 8,2/	2,29 (1H, dd, 15,8,	51,2; 171,2
		2,17 (1H, m)	8,4)	51,2; 171,2
	CO	-	-	-
	CO	-	-	-
	NH	7,71 (1H, s)	7,70 (1H, d)	36,7; 51,2; 171,6
NH ₂	7,32 (1H, s)/	7,31 (1H, s)/	61,8; 171,2	
	6,92 (1 H, s)	6,89 (1H, s)	36,7; 171,2	
Tyr ²	H- α	4,03 (1H, m)	4,02 (1H,m)	35,4; 42,2; 61,2; 128,5; 171,7

	H- β	2,96 (1H, dd, 14,4 e 3,8)	2,96 (1H, dd, 14,3 e 3,7)	56,8; 128,4; 130,2; 171,7
		2,73 (1H, m)	2,73 (1H, m)	56,8; 130,2; 128,4; 172,2
	C- γ	-	-	-
	H- δ e H- θ	7,02 (2H, d, 8,4)	7,01 (2H, d, 8,4)	35,4; 115,5; 130,2; 156,2
	H- ε e H- η	6,66 (2H, d, 8,4)	6,65 (2H, d, 8,4)	128,4; 115,5; 156,2
	CO	-	-	-
	NH	8,71 (2H, t)	8,68 (2H, d)	35,5; 56,8; 173,8
	OH- ζ	9,17 (1H, s)	-	-
Asn³	H- α	4,44 (1H, m)	4,43 (1H, m)	36,4; 171,6
	H- β	2,59 (1H, dd, 15,4 e 9,5)	2,58 (1 H, dd, 15,4 e 9,5)	51,2; 171,5
		2,48 (1H, m)	2,47 (1H, dd)	36,4; 171,5
	CO	-	-	-
	CO	-	-	-
	NH	8,05 (1H, d, 7,6)	8,04 (1H, d, 7,2)	36,4; 51,16; 171,7
	NH ₂	7,21 (1H, s)/ 6,87 (1H, s)	7,19 (1H, s)/ 6,85 (1H, s)	171,5 171,5
Gln⁴	H- α	4,52 (1H, m)	4,51 (1H, m)	27,0
	H- β	2,04 (1H, m)/ 1,74 (1H, m)	2,03 (1H, m)/ 1,75 (1H, m)	31,8; 174,5; 50,1
	H- γ	2,09 (2H, m)	2,09 (2H, m)	27,0; 50,1; 174,5
	CO	-	-	-
	CO	-	-	-
	NH	6,97 (1H, d, 7,8)	6,91 (1H, d)	27,0; 50,1; 171,4
	NH ₂	7,12 (1H, s) 6,85 (2H, s)	7,10 (1H, s) 6,82 (2H, s)	174,5 31,0; 174,5

Prol⁵	H- α	4,17 (2H, m)	4,16 (2H, m)	25,0; 29,2; 47,6; 173,2
	H- β	2,14 (1H,m)/	2,12 (1H, m)	61,2
		1,78 (1H, m)	1,74 (1H, m)	61,2; 173,2
	H- γ	1,98 (1H,m)/	1,98 (1H, m)	47,6; 61,2
		1,88 (1H, m)	1,88 (1H, m)	47,6; 61,2
	H- δ	3,76 (2H, m)	3,75 (2H, m)	25,0; 29,2
CO	-	-	-	
Asn⁶	H- α	4,43 (2H, m)	4,42 (2H, m)	-
	H- β	2,70 (1H, m)/	2,71 (1H, dd)	172,1
		2,45 (1H, m)	2,45 (1H, dd)	50,2; 172,1
	CO	-	-	-
	CO	-	-	-
	NH	8,71 (2H,t)	8,68 (2H,d)	35,5; 51,2; 173,2
	NH ₂	7,36 (1H, s)/	7,35 (1H,s)	172,3
6,85 (2H,s)		6,82 (2H,s)	35,6; 172,3	
Ser⁷	H- α	4,17 (2H, m)	4,16 (2H, m)	61,8; 170,7
	H- β	3,66 (2H, t)	3,66 (2H,d)	56,6; 170,7
	CO	-	-	-
	NH	7,32 (2H, m)	7,32 (1H, d)	56,8; 171,2
	OH- β	4,86 (1H, s)	4,83 (1H, br)	56,6; 61,8
Ácido graxo	1-CO	-	-	-
	2	2,34 (2H, m)	2,33 (2H, m)	171,6
	3	3,99 (1H,m)	3,97 (1H, m)	-
	4	1,41 (2H, m)	1,40 (2H, m)	25,7
	5	1,25 (1H, m)/	1,28 (1H, m)	27,3; 29,0
		1,11 (1H, m)	1,16 (1H, m)	27,3
	6-10 ^c	1,13 (1H, m)/1,24 (s)	1,24 (s)	25,8; 29,0
	11 ^c	1,24 (s)	1,25-1,10	29,2-29,6
	12 ^c	1,24 (s)	1,25-1,10	29,2-29,6
	13 ^c	1,24 (s)	1,25	38,9
	14 ^c	1,14 (m)	1,10	22,9; 27,8

15°	1,49 (1H, m)	1,49 (1H, m)	22,9; 38,9
16°	0,84 (6H, d, 6,5)	0,83 (6H, d, 6,6)	27,8
3-NH	7,14 (1H, d, 8,4)	7,12 (1H, d)	170,7

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ¹H e 125 MHz ¹³C com DMSO-*d*₆, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com HIRADATE et al., 2002 (H; 600 MHz, DMSO-*d*₆). (δ) Deslocamento químico em ppm, (-) não identificado.



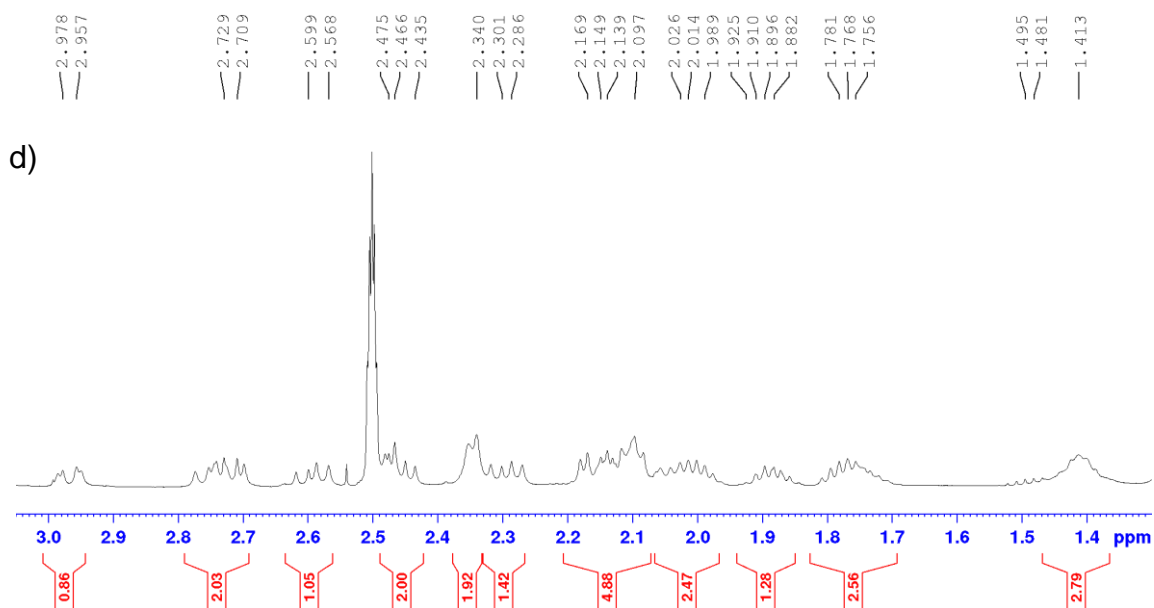


Figura 90. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Iturina A4 em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N e aromáticos; b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos; c) hidrogênios metilênicos e metílicos; d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH_2 , β e γ).

Tabela 36. Dados de RMNN de ^1H e HMBC, da amostra Iturina 4.

Amino ácido	Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^a
Asn ¹	H- α	4,43 (2H, m)	4,42 (2H, m)	173,8
	H- β	2,28 (1H, dd, 15,6 e 8,2/	2,29 (1H, dd, 15,8,	51,2; 171,2
		2,16 (1H, m)	8,4)	51,2; 171,2
	CO			
	CO			
NH	NH	7,71 (1H, s)	7,70 (1H, d)	36,7; 51,2; 171,6
	NH ₂	7,33 (1H, s)/	7,31 (1H, s)	61,8; 171,2
		6,91 (1 H, s)	6,89 (1H, s)	36,7; 171,2
Tyr ²	H- α	4,03 (1H, m)	4,02 (1H,m)	35,4; 42,2; 61,2; 128,5; 171,7
	H- β	2,95 (1H, dd, 14,4 e 3,8)/	2,96 (1H, dd, 14,3 e	56,8; 128,4;
		2,72 (1H, m)	3,7)/	130,2; 171,7
		2,73 (1H, m)	56,8; 130,2; 128,4; 172,2	

	C- γ	-	-	-
	H- δ e H- θ	7,02 (2H, d, 8,4)	7,01 (2H, d, 8,4)	35,4; 115,5; 130,2; 156,2
	H- ε e H- η	6,66 (2H, d, 8,4)	6,65 (2H, d, 8,4)	128,4; 115,5; 156,2
	CO	-	-	-
	NH	8,71 (2H, t)	8,68 (2H, d)	35,5; 56,8; 173,8
	OH- ζ	9,17 (1H, s)	-	-
Asn³	H- α	4,44 (1H, m)	4,43 (1H, m)	36,4; 171,6
	H- β	2,59 (1H, dd, 15,4 e 9,5)	2,58 (1 H, dd, 15,4 e 9,5)	51,2; 171,5
		2,47 (1H, m)	2,47 (1H, dd)	36,4; 171,5
	CO			
	CO			
	NH	8,05 (1H, d, 7,6)	8,04 (1H, d, 7,2)	36,4; 51,16; 171,7
	NH ₂	7,21 (1H, s)	7,19 (1H, s)	171,5
		6,87 (1H, s)	6,85 (1H, s)	171,5
Gln⁴	H- α	4,52 (1H, m)	4,51 (1H, m)	27,0
	H- β	2,01 (1H, m)	2,03 (1H, m)	31,8; 174,5;
		1,75 (1H, m)	1,75 (1H, m)	50,1
	H- γ	2,09 (2H, m)	2,09 (2H, m)	27,0; 50,1; 174,5
	CO	-	-	-
	CO	-	-	-
	NH	6,96 (1H, d, 7,8)	6,91 (1H, d)	27,0; 50,1; 171,4
	NH ₂	7,12 (1H, s)	7,10 (1H, s)	174,5
		6,85 (2H, s)	6,82 (2H, s)	31,0; 174,5
Prol⁵	H- α	4,17 (2H, m)	4,16 (2H, m)	25,0; 29,2; 47,6; 173,2
	H- β	2,14 (1H,m)/	2,13 (1H, m)	61,2
		1,78 (1H, m)	1,74 (1H, m)	61,2; 173,2
	H- γ	1,98 (1H,m)/	1,98 (1H, m)	47,6; 61,2

		1,88 (1H, m)	1,88 (1H, m)	47,6; 61,2
	H- δ	3,76 (2H, m)	3,75 (2H, m)	25,0; 29,2
	CO	-	-	-
Asn⁶	H- α	4,43 (2H, m)	4,42 (2H, m)	-
	H- β	2,70 (1H, m)/	2,71 (1H, dd)	172,1
		2,46 (1H, m)	2,45 (1H, dd)	50,2; 172,1
	CO	-	-	-
	CO	-	-	-
	NH	8,71 (2H,t)	8,68 (2H,d)	35,5; 51,2;
	NH ₂	7,37 (1H, s)/	7,35 (1H,s)	173,2
		6,85 (2H,s)	6,82 (2H,s)	172,3
Ser⁷	H- α	4,17 (2H, m)	4,16 (2H, m)	35,6; 172,3
	H- β	3,67 (2H, t)	3,66 (2H,d)	61,8; 170,7
	CO	-	-	56,6; 170,7
	NH	7,32 (2H, m)	7,32 (1H, d)	-
	OH- β	4,86 (1H, s)	4,83 (1H, br)	56,8; 171,2
Ácido graxo	1-CO	-	-	56,6; 61,8
	2	2,34 (2H, m)	2,33 (2H, m)	-
	3	3,99 (1H,m)	3,97 (1H, m)	171,6
	4	1,41 (2H, m)	1,40 (2H, m)	-
	5	1,25 (1H, m)/	1,28 (1H, m)	25,7
		1,12 (1H, m)	1,16 (1H, m)	27,3; 29,0
	6 ^c	1,13 (1H, m)/1,24 (s)	1,24 (s)	27,3
	7-11 ^c	1,24 (s)	1,25-1,10	25,8; 29,0
	12 ^c	1,24 (s)	1,25	29,2-29,6
	13 ^c	1,13 (m)	1,10	27,8
	14 ^c	1,49 (1H, m)	1,49 (1H, m)	22,9
	15 ^c , 16 ^c	0,84 (6H, d, 6,5)	0,83 (6H, d, 6,6)	22,9
	7-13 ^d	1,24 (s)	1,25-1,10	27,8; 38,8
	14 ^d	1,24 (m)	1,25	29,2-29,6
	15 ^d	1,26 (m)	1,25	22,5
	16 ^d	0,85 (3H, t)	0,84 (3H, t)	14,2; 31,6
				22,5; 31,6

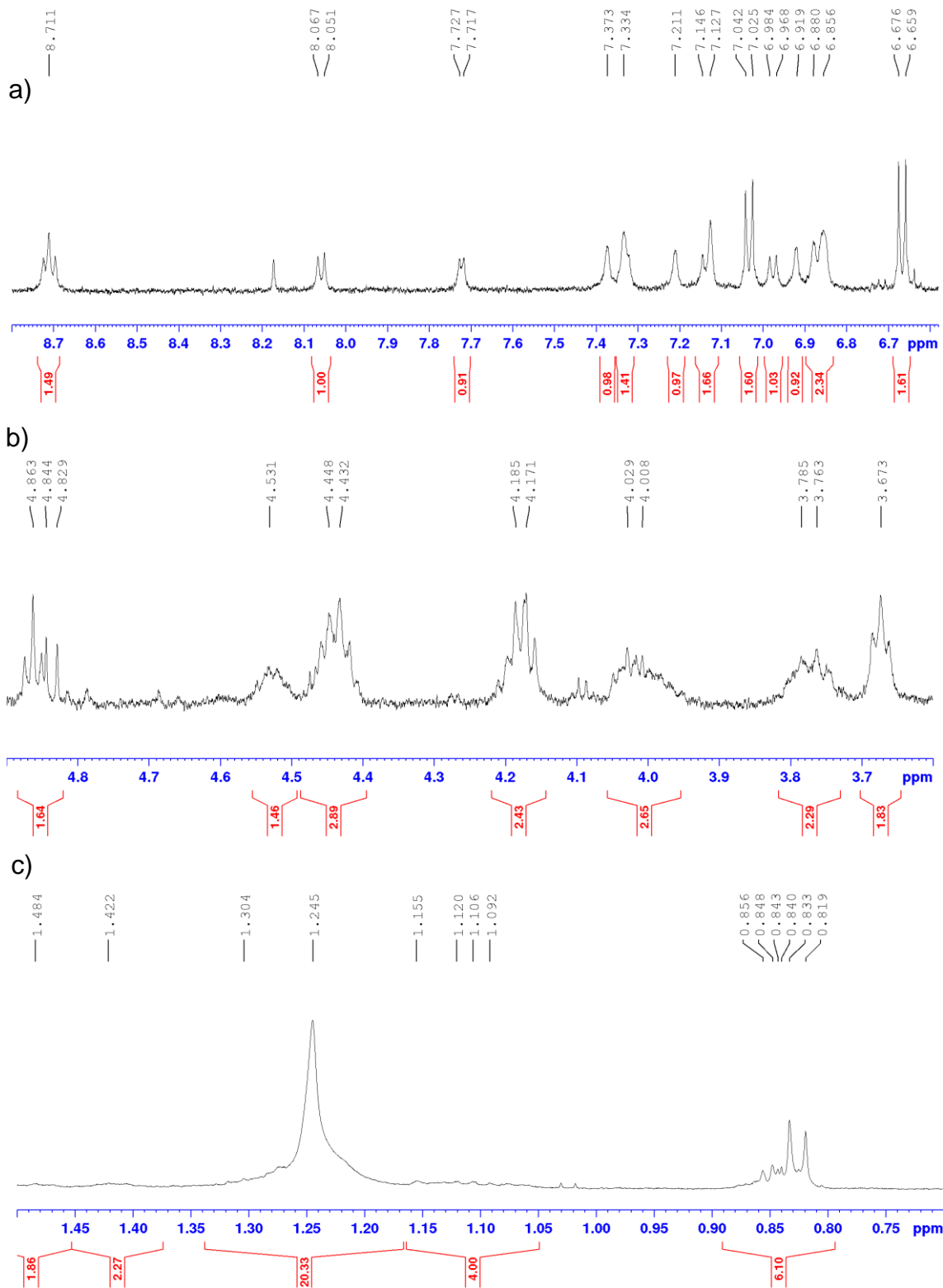
3-NH

7,14 (1H, d, 8,4)

7,12 (1H, d)

170,7

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ¹H e 125 MHz ¹³C com DMSO-*d*₆, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com HIRADATE et al., 2002 (H; 600 MHz, DMSO-*d*₆). ^cDados para isoforma *iso*-C16. ^dDados para isoforma *normal*-C16 (δ) Deslocamento químico em ppm, (-) não identificado.



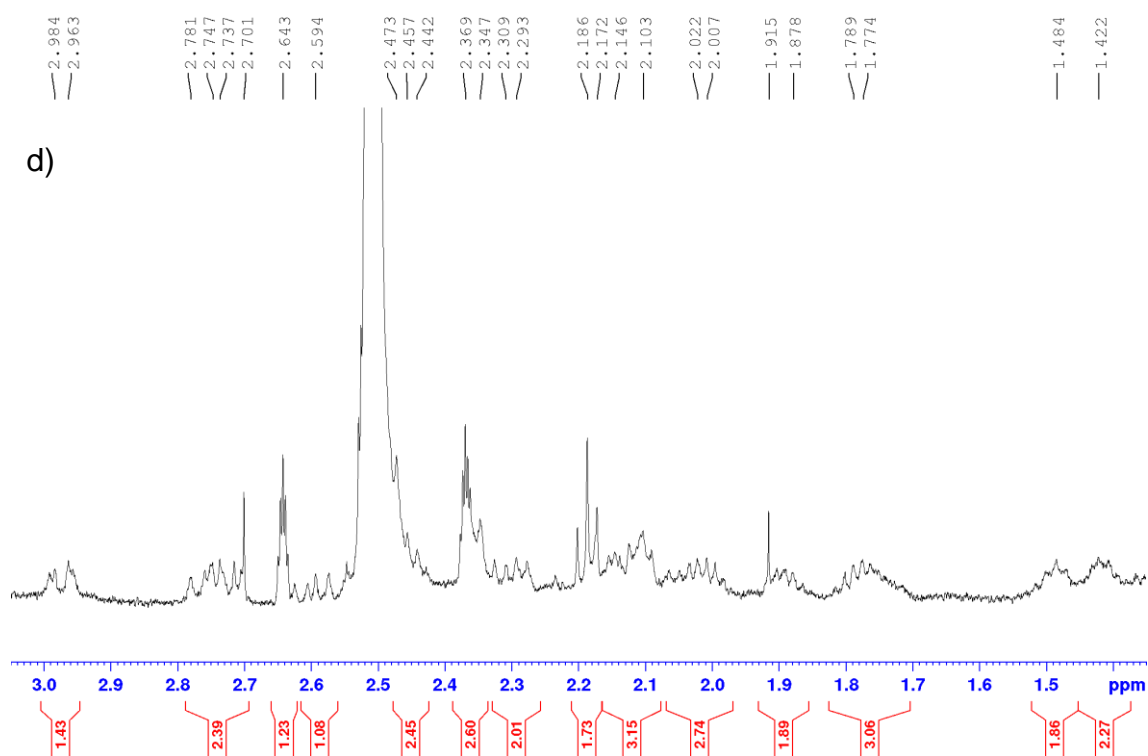


Figura 91. Ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra Iturina A5 em DMSO- d_6 (500 MHz): a) região dos hidrogênios ligados a N e aromáticos; b) hidrogênios α -metínicos e β -metilênicos; c) hidrogênios metilênicos e metílicos; d) região dos hidrogênios alifáticos (CH ou CH_2 , β e γ).

Tabela 37. Dados de RMN de ^1H e HMBC, da amostra Iturina A5.

Amino ácido	Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^a
Asn ¹	H- α	4,43 (2H, m)	4,42 (2H, m)	-
	H- β	2,29 (1H, dd, 15,6 e 8,2/	2,29 (1H, dd, 15,8,	-
		2,17 (1H, m)	8,4)	-
	CO		2,16 (1H, dd)	-
CO			-	
NH		7,71 (1H, s)	7,70 (1H, d)	-
	NH ₂	7,33 (1H, s)/	7,31 (1H, s)	-
		6,91 (1 H, s)	6,89 (1H, s)	-
Tyr ²	H- α	4,02 (1H, m)	4,02 (1H,m)	-

	H- β	2,96 (1H, dd, 14,4 e 3,8)	2,96 (1H, dd, 14,3 e 3,7)	-
		2,73 (1H, m)	2,73 (1H, m)	-
	C- γ			-
	H- δ e H- θ	7,02 (2H, d, 8,4)	7,01 (2H, d, 8,4)	156,2
	H- ε e H- η	6,65 (2H, d, 8,4)	6,65 (2H, d, 8,4)	128,4
	CO	-	-	-
	NH	8,71 (2H, t)	8,68 (2H, d)	-
	OH- ζ	9,17 (1H, s)	-	-
Asn³	H- α	4,44 (1H, m)	4,43 (1H, m)	-
	H- β	2,59 (1H, dd, 15,4 e 9,5)	2,58 (1 H, dd, 15,4 e 9,5)	-
		2,47 (1H, m)	2,47 (1H, dd)	-
	CO			-
	CO			-
	NH	8,05 (1H, d, 7,6)	8,04 (1H, d, 7,2)	-
	NH ₂	7,21 (1H, s)	7,19 (1H, s)	-
		6,87 (1H, s)	6,85 (1H, s)	-
Gln⁴	H- α	4,53 (1H, m)	4,51 (1H, m)	-
	H- β	2,02 (1H, m)	2,03 (1H, m)	-
		1,77 (1H, m)	1,75 (1H, m)	-
	H- γ	2,10 (2H, m)	2,09 (2H, m)	-
	CO			-
	CO			-
	NH	6,96 (1H, d, 7,8)	6,91 (1H, d)	-
	NH ₂	7,12 (1H, s)	7,10 (1H, s)	-
		6,85 (2H, s)	6,82 (2H, s)	-
Prol⁵	H- α	4,17 (2H, m)	4,16 (2H, m)	-
	H- β	2,14 (1H,m)/	2,13 (1H, m)	-
		1,78 (1H, m)	1,74 (1H, m)	-
	H- γ	1,98 (1H,m)/	1,98 (1H, m)	-
		1,88 (1H, m)	1,88 (1H, m)	-
	H- δ	3,75 (2H, m)	3,75 (2H, m)	-
	CO	-	-	-

Asn⁶	H- α	4,43 (2H, m)	4,42 (2H, m)	-
	H- β	2,70 (1H, m)/	2,71 (1H, dd)	-
		2,47 (1H, m)	2,45 (1H, dd)	-
	CO	-	-	-
	CO	-	-	-
	NH	8,71 (2H,t)	8,68 (2H,d)	-
	NH ₂	7,37 (1H, s)/	7,35 (1H,s)	-
6,85 (2H,s)		6,82 (2H,s)	-	
Ser⁷	H- α	4,17 (2H, m)	4,16 (2H, m)	-
	H- β	3,67 (2H, t)	3,66 (2H,d)	-
	CO			-
	NH	7,33 (2H, m)	7,32 (1H, d)	-
	OH- β	4,86 (1H, s)	4,83 (1H, br)	-
Ácido graxo	1-CO			
	2	2,36 (2H, m)	2,33 (2H, m)	40,1
	3	4,00 (1H,m)	3,97 (1H, m)	-
	4	1,42 (2H, m)	1,40 (2H, m)	-
	5	1,25 (1H, m)/	1,28 (1H, m)	-
		1,09 (1H, m)	1,16 (1H, m)	-
	6	1,10 (1H, m)/1,23 (s)	1,24 (s)	-
	7-11	1,24 (s)	1,25-1,10	29,2-29,5
	12	1,24 (s)		27,8
	13	1,24 (s)	1,25-1,10	29,6
	14	1,09 (s)		19,5
	15	1,08 (m)	1,10	19,5; 36,5
	16	0,80 (m)	1,49 (1H, m)	34,2; 36,5
	17	0,82 (6H, d, 6,5)	0,83 (6H, d, 6,6)	29,6
	3-NH	7,12 (1H, d, 8,4)	7,12 (1H, d)	170,7

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ¹H e 125 MHz ¹³C com DMSO-*d*₆, utilizando o TMS como padrão interno, ^bDados da literatura de acordo com HIRADATE et al., 2002 (H; 600 MHz, DMSO-*d*₆), (δ) Deslocamento químico em ppm, (-) não identificado.