



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PAULA DE OLIVEIRA GOUVEIA

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS PRODUZIDOS POR *Bacillus* *velezensis* CMRP4490

Londrina – Paraná
2024

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

PAULA DE OLIVEIRA GOUVEIA

**PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
ANTIFÚNGICOS PRODUZIDOS POR *Bacillus*
velezensis CMRP4490**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Admilton Gonçalves de Oliveira Junior

**Londrina – Paraná
2024**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

P324p gouveia, Paula.
 PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS
 PRODUZIDOS POR *Bacillus velezensis* CMRP4490 / paula gouveia. -
 Londrina, 2024.
 f. 45: il.

 Orientador: Admilton Gonçalves de Oliveira Junior.
 Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) -
 Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em
 Ciências Biológicas, 2024.
 Inclui bibliografia.

1. Metabólitos secundários - TCC. 2. Extração - TCC. 3. Purificação - TCC. 4.
Bacillus - TCC. I. Gonçalves de Oliveira Junior, Admilton . II. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências
Biológicas. III. Título.

CDU 579

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior

Prof. Dr. Doumit Camilios Neto

Ms. Maria Luiza Abreu Nicoletto

Dra. Sandrielle Aparecida Noriler

Londrina, 10 de maio de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Laboratório de Biotecnologia Microbiana, a todos os companheiros de laboratório, especialmente ao meu orientador Admilton pela oportunidade, a Maria Luiza por toda a ajuda, paciência e carinho. Agradeço também ao Angelo que me auxiliou e apoiou em todos os momentos e a minha família por todo o incentivo, não chegaria até aqui sem vocês.

OLIVEIRA, Paula Gouveia. **PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS PRODUZIDOS POR *Bacillus velezensis* CMRP4490**. 2024. 45 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2024.

RESUMO

Perdas agrícolas significativas são causadas por fungos fitopatogênicos todos os anos, na busca por soluções ecologicamente corretas e economicamente viáveis, os produtos biotecnológicos surgem como uma excelente escolha. O presente trabalho teve como objetivo produzir e extrair as moléculas com ação antifúngica produzidas por *Bacillus velezensis* CMRP4490 contra os fungos fitopatógenos *Machophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. Por meio de uma fermentação líquida submersa foram obtidos biomassa contendo o microrganismo e os produtos provenientes de seu metabolismo. Os métodos utilizados para a extração de metabólitos secundários foram: Extração em Fase Sólida (EFS), Precipitação Ácida (PA) em pH 2,0 e pH 4,0 e uma metodologia de otimização, aliando ambas as extrações (PA e EFS) visando a separação de metabólitos secundários com características lipopeptídicas. Todas as metodologias foram acompanhadas de testes *in vitro* pelo método de *Spot On The Lawn* (SOTL) utilizando os fitopatógenos *M. phaseolina* e/ou *R. solani*. A zona de inibição de cada extrato foi medida em milímetros sendo que, aquele com maior atividade contra os fitopatógenos foi o precipitado em pH 4,0 proveniente da metodologia otimizada (PA + EFS) atingindo halos de 30 mm, a mesma amostra atingiu inibição total do fungo *M. phaseolina* na concentração 250 ug/ml. É possível inferir que os lipopeptídeos produzidos por *B. velezensis* CMRP4490 tem ação antifúngica, sendo necessária a aplicação de metodologias para a purificação e identificação destes.

Palavras-chave: Antifúngico. *Bacillus*. Extração.

OLIVEIRA, Paula Gouveia. **PRODUCTION AND EXTRACTION OF ANTIFUNGAL COMPOUNDS PRODUCED BY *Bacillus velezensis* CMRP4490.** 2024. 45 pgs. Final Dissertation (Biological Sciences Undergraduation) - Londrina State University. Londrina. 2024.

ABSTRACT

Significant agricultural losses are caused by phytopathogenic fungi every year, in the search for ecologically correct and economically viable solutions, biotechnological products emerge as an excellent choice. The present work aimed to produce and extract molecules with antifungal action produced by *Bacillus velezensis* CMRP4490 against the phytopathogenic fungi *Machophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*. The microorganism and the products resulting from its metabolism were obtained through submerged liquid fermentation. The methods used for the extraction of secondary metabolites were: Solid Phase Extraction (EFS), Acid Precipitation (PA) at pH 2.0 and pH 4.0 and an optimization methodology, combining both extractions (PA and EFS) aiming the separation of secondary metabolites with lipopeptide characteristics. All methodologies were accompanied by in vitro tests using the Spot On The Lawn (SOTL) method using the phytopathogens *M. phaseolina* and/or *R. solani*. The inhibition halo of each extract was measured in millimeters, and the one with the greatest activity against phytopathogens was the precipitate at pH 4.0 from the optimized methodology (PA + EFS), reaching halos of 30 mm, which achieved total inhibition of the fungus *M. phaseolina* at a concentration of 250 ug/ml. It is possible to infer that the lipopeptides produced by *B. velezensis* CMRP4490 have antifungal action, making it necessary to apply methodologies for their purification and identification.

Keywords: Antifungal. *Bacillus*. Extraction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Doenças causadas por fungos do solo sobre as principais culturas agrícolas no Brasil.....	20
Tabela 2: Compostos produzidos por <i>M. phaseolina</i>	23
Tabela 3: Contagem de células viáveis e endósporos com 24 horas e 36 horas.	35
Tabela 4: Rendimento dos extratos liofilizados.	36
Tabela 5: Medida em diâmetro dos halos no teste <i>spot on the lawn</i> contra <i>M. phaseolina</i> na concentração de 250 ug/10µl	38
Tabela 6: Medida em diâmetro dos halos no teste SOTL contra <i>R. solani</i> em concentração de 500 ug/10µl	39
Tabela 7: Medida em diâmetro do fungo <i>M. phaseolina</i> durante o teste de concentração mínima inibitória.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Teste de poço difusão utilizando 200µl de sobrenadante livre de células (líquido) contra os fitopatógenos <i>M. phaseolina</i> e <i>R. solani</i>	36
Figura 2: Teste SOTL utilizando extratos contra <i>M. phaseolina</i> em concentração de 250ug/10µl	37
Figura 3: Teste SOTL utilizando extratos contra <i>R. solani</i> em concentração de 500 ug/10µl	38
Figura 4: Teste de concentração mínima inibitória com 72 horas de incubação contra <i>M. phaseolina</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Batata Dextrose Ágar
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMRP	Coleção Microbiológica da Rede Paranaense
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
COSY	Correlation Spectroscopy
EFS	Extração em Fase Sólida
ICM	Inibição do Crescimento Micelial
ISR	<i>Induced Systemic Resistance</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MBCAs	Microbial Biological Control Agents
MID	Manejo Integrado de Doenças
MIP	Manejo Integrado de Pragas
NRPSs	<i>Non-ribosomal Peptide Synthetases</i>
PGPB	<i>Plant Growth Promoting Bacteria</i>
SAR	<i>Systemic Acquired Resistance</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 AGRONEGÓCIO NO BRASIL	18
2.2 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	19
2.2.1 <i>Macrophomina phaseolina</i>	22
2.2.2 <i>Rhizoctonia solani</i>	24
2.3 Controle biológico	25
2.3.1 <i>Bacillus</i>	26
2.3.2 Compostos antifungicos	27
2.3.3 Lipopeptídeos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Microrganismos	29
3.2 Produção dos metabólitos	30
3.3 Contagem de células viáveis	31
3.4 Tratamento térmico	31
3.5 Teste de poço-difusão em ágar	31
3.6 Extração dos metabólitos	32
3.6.1 Extração em Fase Sólida (EFS) do Extrato Bruto (EB)	32
3.6.2 Precipitação ácida (PA) em pH 2,0	32
3.6.3 Precipitação ácida (PA) em pH 4,0	33
3.6.4 EFS dos Precipitados (P) obtidos na Precipitação Ácida (PA)	33
3.7 Teste de difusão em ágar Spot on The Lawn (STL)	33
3.8 Concentração Inibitória mínima (CIM)	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Contagem de células viáveis e tratamento térmico	35

4.2 Teste de poço difusão em ágar	35
4.3 Teste de difusão em ágar Spot On The Lawn (SOTL)	37
5. CONCLUSÕES	43

1 INTRODUÇÃO

2
3 Estima-se que a população global deverá atingir cerca de 9,7 bilhões de
4 pessoas até 2050, segundo dados do Departamento de Assuntos Sociais e
5 Econômicos da ONU (2022). Para suprir a crescente demanda por alimentos, o
6 sistema de produção alimentícia global deverá passar por mudanças para garantir a
7 segurança alimentar e nutrição de qualidade a todos (FAO, 2017).

8 Um dos principais obstáculos para o aumento na produção agrícola reside na
9 incidência de doenças provocadas por fitopatógenos, ocasionando a redução média
10 de 15 a 25% da produção (VILLA-RODRIGUEZ et al., 2016).

11 A aplicação de defensivos químicos sintéticos é o método mais utilizado para a
12 redução das perdas na produção agrícola, o uso contínuo ou em excesso destes pode
13 ser associado a riscos ambientais e à saúde. A partir dessas questões faz-se
14 necessário o desenvolvimento de métodos inovadores para a diminuição dos
15 prejuízos causados por fitopatógenos (AZIZBEKYAN, 2019; MICHEREFF et al.,
16 2005).

17 O fungo *Macrophomina phaseolina*, é cosmopolita e promotor de perdas
18 substanciais de rendimento, afetando em torno de 800 espécies de plantas em
19 diferentes estágios de desenvolvimento (BITANCOURT, 1935). No Brasil, esse
20 fitopatógeno foi detectado pela primeira vez em raízes de feijão e sucessivamente
21 passou a infectar outros cultivares, de acordo com Wrather et al. (1997).

22 O fungo *Rhizoctonia solani* é um fitopatógeno capaz de infectar uma ampla
23 gama de hospedeiros, podendo afetar as sementes, frutos, mudas, talo, raiz e folhas
24 (OGOSHI, 1985), tendo como consequência à morte prematura da planta e redução
25 da produtividade (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2000). Apresentando ampla

26 disseminação, *R. solani* pode ser classificado como um fungo de difícil controle,
27 devido à complexidade do seu comportamento ecológico (ZILLI et al., 2007).

28 Os produtos biotecnológicos surgem destacando-se pela sustentabilidade e
29 aplicabilidade, suprimindo ou eliminando agentes patogênicos por meio de produção
30 de biomoléculas, com grande especificidade e rápida degradação, podendo ser
31 empregados isoladamente, ou associados a outros métodos de controle (CORDEAU
32 et al., 2016; SUTTON et al., 2016).

33 Diante da importância pela busca de novos compostos que apresentem baixa
34 toxicidade e menor custo de produção, o gênero *Bacillus* torna-se uma excelente
35 escolha para o desenvolvimento de um fungicida altamente eficiente devido a ampla
36 diversidade metabólica associada à sua presença em diferentes ecossistemas
37 (KUPPER et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2010).

38 Bactérias do gênero *Bacillus*, são Gram-positivas, com formato de bastonetes
39 e podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos. Reconhecidas por auxiliarem no
40 crescimento de plantas, podem também serem utilizadas como antagonistas contra
41 bactérias, fungos e nematóides produzindo compostos que atuam como bactericidas,
42 bacteriostático e fungicidas (SCHILLINGER et al., 1996; JOGIAH et al., 2016; SILVA
43 et al., 2018).

44 Através da produção de moléculas bioativas como os lipopeptídeos cíclicos
45 classificados em surfactinas, iturinas e fengicinas, os representantes do gênero *Bacillus*
46 têm a capacidade de agir de forma direta, inibindo o crescimento de patógenos ou
47 indireta, estimulando a resistência sistêmica nas plantas hospedeiras (HASHIM et al.,
48 2019).

49 A utilização de lipopeptídeos no setor agrícola ou alimentar é amplamente empregado,
50 contudo, o desenvolvimento de processos analíticos eficientes e economicamente

51 viáveis é crucial para o desenvolvimento de metodologias que concedam resultados
52 satisfatórios após os processos de extração dos compostos de interesse (ONGENA;
53 JACQUES, 2008).

54 A cepa *B. velezensis* CMRP 4490 apresenta grande potencial já relatados *in*
55 *sílico* anteriormente, contudo, a purificação dos metabólitos produzidos pelo
56 microrganismo ainda é uma área inexplorada, assim, o objetivo deste trabalho foi
57 produzir, extrair, fracionar e avaliar as moléculas com ação antifúngica contra *M.*
58 *phaseolina* e *R. solani*.

59 2 REVISÃO DE LITERATURA

60 2.1 AGRONEGÓCIO NO BRASIL

61
62 A agricultura no Brasil é uma atividade econômica estratégica que se destaca
63 mundialmente em relação à produção de insumos e commodities como, açúcar,
64 laranja, café, soja, milho e algodão (FAOSTAT, 2019).

65 Em 2023, o PIB do agronegócio correspondeu a 23,8% do PIB do país, sendo
66 que a soja e derivados, lideram o mercado, atingindo cerca de 40,4% das exportações
67 nacionais, contribuindo ativamente para o faturamento de US\$166 bilhões
68 anualmente. (CEPEA/ USP/ CNA 2023).

69 O crescimento da agricultura brasileira nas últimas décadas deve-se principalmente
70 ao consumo de químicos sintéticos amplamente utilizados para o manejo de
71 fitopatógenos. Em 2021, o Brasil consumiu cerca de 720.870 toneladas de
72 agrotóxicos, o uso intensivo destes impacta negativamente a saúde humana, o meio
73 ambiente e eventualmente promove a aquisição de resistência contra os defensivos.
74 Isso se deve a seu alto potencial bioacumulativo e resistência à decomposição por
75 fatores biológicos (SAVOY, 2011; MURAKAMI et al., 2014).

76 Dentre as problemáticas associadas à produção agrícola, o crescimento
77 populacional tornou-se um importante tema, estima-se que a população global deverá
78 atingir cerca de 9,7 bilhões de pessoas até 2050, segundo dados do Departamento
79 de Assuntos Sociais e Econômicos da ONU (2022).

80 Para suprir a crescente demanda por alimentos e diminuir as perdas
81 decorrentes de estresse bióticos e abióticos (10 a 40% da produção global), o sistema
82 de produção inseriu novas práticas de Manejo Integrado de Pragas e Doenças (IPDM),
83 que se constituem da combinação de métodos biológicos, culturais e químicos de
84 forma otimizada, com o objetivo de diminuir os impactos ambientais e manter o
85 equilíbrio econômico (GASQUES et al., 2012; FAO, 2017; MOREIRA et al., 2017).

86 Dados indicam que cerca de 21,5% do trigo, 30% do arroz, 22,6% do milho,
87 17,2% da batata e 21,4% da soja são afetados por insetos e outros patógenos,
88 contribuindo para uma busca crescente por novos métodos para o controle de
89 fitopatógenos que sejam economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis
90 (CARVAJAL-YEPES et al., 2019).

91 Os produtos biotecnológicos surgem destacando-se pela sustentabilidade e
92 aplicabilidade, suprimindo ou eliminando agentes patogênicos por meio de produção
93 de biomoléculas, com grande especificidade e rápida degradação, podendo ser
94 empregados isoladamente, ou associados a outros métodos de controle (CORDEAU
95 et al., 2016; SUTTON et al., 2016; RÊGO-MACHADO et al., 2021).

96 **2.2 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

97 Os fungos representam o maior grupo de organismos fitopatogênicos, ocorrem
98 em diversos tipos de sistemas agrícolas e causam doenças que podem afetar todos
99 os estágios de desenvolvimento das plantas (MICHEREFF et al., 2005; CORREIA;
100 MICHEREFF, 2018).

101 O ambiente como um todo, bem como as características do solo e da rizosfera
 102 determinam quais microrganismos estarão presentes, afetando diretamente a
 103 possibilidade de patógenos causarem ou não doenças (CHIARAMONTE; MENDES;
 104 MENDES, 2020).

105 Os fungos do solo podem sobreviver por longos períodos de forma inativa,
 106 como estruturas de resistência que apresentam atividade metabólica nula ou reduzida,
 107 sendo que alguns fungos podem produzir esporos e serem facilmente transportados
 108 por ar ou água (HILLOCKS; WALLER, 1997; MICHEREFF et al., 2005).

109 Após a germinação do propágulo, o fungo entra contato com as raízes do
 110 hospedeiro iniciando a fase de colonização, caracterizada pela invasão progressiva
 111 dos tecidos vegetais e o consequente aumento da produção de biomassa do fungo.
 112 Quando a disponibilidade de energia decresce, ocorre a redução na produção de
 113 biomassa e os fungos voltam a se diferenciar em estruturas de resistência (CORREIA;
 114 MICHEREFF, 2018).

115 Dentre as principais culturas é possível classificar os fungos fitopatógenos que
 116 mais as acometem. Os principais gêneros de fungos fitopatógenos desencadeadores
 117 de infecções são *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotinia* e *Macrophomina*.

118 **Tabela 1:** Doenças causadas por fungos do solo sobre as principais culturas agrícolas no Brasil.

Cultura	Tipo de doença	Patógeno	Referência
Soja	Tombamento de plântulas	• <i>Rhizoctonia solani</i>	LANUBILE et al., (2015). MICHEREFF et al, (2005).
	Murcha-de-fusarium	• <i>Pythium spp.</i>	
	Murcha-de-esclerócio	• <i>Fusarium oxysporum f.sp. glycines</i>	
	Podridão cinzenta do caule	• <i>Sclerotium rolfsii</i>	
	Podridão branca	• <i>Macrophomina phaseolina</i>	
	Podridão radicular seca	• <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
	Cancro da haste	• <i>Fusarium solani f. sp. sojae</i>	
Milho	Podridão do colmo	• <i>Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis</i>	COSTA et al, (2019). MICHEREFF et al, (2005).
	Queima de plântulas	• <i>Macrophomina phaseolina</i>	
		• <i>Pythium spp.</i>	
		• <i>Rhizoctonia solani</i>	

Cana de açúcar	Podridão abacaxi	• <i>Thielaviopsis paradoxa</i>	BORGES et al., (2019). MICHEREFF et al., (2005).
	Podridão radicular	• <i>Pythium spp.</i>	
	Podridão de esclerócio	• <i>Sclerotium rolfsii</i>	
Café	Podridão radicular	• <i>Rosellinia spp.</i>	MICHEREFF et al., (2005). MONTEIRO et al., (2017).
	Podridão do caule	• <i>Fusarium solani</i>	
	Rizoctoniose	• <i>Rhizoctonia solani</i>	
Feijão	Murcha-de-fusarium	• <i>Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli</i>	HENRIQUE et al., (2015). MICHEREFF et al., (2005).
	Podridão radicular seca	• <i>Fusarium solani f sp. phaseoli</i>	
	Podridão cinzenta do caule	• <i>Macrophomina phaseolina</i>	
	Podridão branca	• <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
	Murcha de esclerócio	• <i>Sclerotium rolfer</i>	
	Tombamento de plântulas	• <i>Rhizoctonia solani</i> • <i>Pythium spp.</i>	
Trigo	Mosaico do trigo	• <i>Polymyxa graminis</i>	DALBOSCO et al., (2002)
Arroz	Podridão do caule	• <i>Sclerotium rolfsii</i>	AMAIZ et al., (2017). MICHEREFF et al., (2005).
	Rizoctoniose	• <i>Rhizoctonia solani</i>	
	Podridão radicular	• <i>Pythium spp</i>	
Algodão	Tombamento de plântulas	• <i>Rhizoctonia solani</i>	HALPERN et al., (2013). MICHEREFF et al. (2005).
	Podridão negra	• <i>Pythium spp.</i>	
	Murcha-de-fusarium	• <i>Thielaviopsis basicola</i>	
	Murcha-de-verticílio	• <i>Fusarium oxysporum f. sp. vasinfecton</i>	
	Podridão cinzenta do caule	• <i>Verticillium dahliae</i>	
Mandioca	Podridão radicular seca	• <i>Fusarium solani</i>	MICHEREFF et al., 2005 STEFANELLO et al., 2017
	Podridão radicular mole	• <i>Platophthora drechsleri;</i>	
	Podridão do colo	• <i>Sclerotium rolfsii</i>	
	Podridão negra	• <i>Rosellinia necatrix</i>	
Laranja	Podridão do pé	• <i>Phytophthora spp.</i>	MITCHEREF F et al. 2005 SÁENZ PEREZ et al. 2019
	Podridão de fusário	• <i>Fusarium solani</i>	

120

121 **2.2.1 *Macrophomina phaseolina***

122 O fungo *Macrophomina phaseolina* foi descrito por Tassi em 1901, pertencente
123 à divisão *Ascomycota*, classe *Dothideomycetes* e família *Botryosphaeriaceae*, é
124 classificado como um fungo necrotrófico, patógeno que causa a morte do hospedeiro
125 e obtêm nutrientes do tecido morto (SALES JÚNIOR et al., 2020; LODHA; MAWAR,
126 2020; FARR; ROSSMAN, 2022).

127 Em culturas *in vitro*, *M. phaseolina* apresenta-se com coloração variável
128 dependendo do tempo de incubação e meio de cultura utilizado, as colônias vão de
129 cinza, marrom até preto (DHINGRA e SINCLAIR 1978; KAUR, DHILLON, BRAR,
130 VALLAD, et al. 2012; SHORT, WYLLIE E AMMON 1978).

131 No Brasil, esse fitopatógeno foi detectado pela primeira vez em raízes de feijão
132 e sucessivamente passou a infectar outros cultivares, causando doenças como:
133 podridão do carvão, podridão cinzenta do caule, podridão das raízes, tombamento e
134 danos às sementes, sendo mais agressiva em países tropicais e subtropicais, de clima
135 semiárido (WRATHER et al. 1997; KAUR et al. 2013; KHAN et al, 2017).

136 A ampla variabilidade morfológica, fisiológica, patogênica e genética torna *M.*
137 *phaseolina* um fungo cosmopolita e promotor de perdas substanciais de rendimento,

138 afetando em torno de 800 espécies de plantas de valor comercial, como: soja,
 139 melão, melancia, feijão, sorgo e algodão (VENDAS JÚNIOR et al., 2020; LODHA;
 140 ROSA, 2020; LONGE; ROSMAN, 2022).

141 A capacidade de sobreviver durante longos períodos em reservatórios biológicos
 142 como: resíduos culturais e sementes, ocorre através de estruturas de de sobrevivência
 143 composta por múltiplas hifas, conhecidas como microescleródios, esses, promovem
 144 resistência à degradação física, química e biológica (BOLTON; THOMMA; NELSON,
 145 2006).

146 Quando em estado patogênico, o fungo *M. phaseolina* coloniza o tecido
 147 vascular, adentra o córtex e penetra nos vasos do xilema, podendo migrar em direção
 148 à raiz, onde obstrui mecanicamente os vasos, causando desidratação e desnutrição
 149 da planta, levando ao processo de murcha até morte (KAUR, DHILLON, BRAR,
 150 VALLAD, et al. 2012; MAYEK-PÉREZ et al. 2002).

151 Além da produção de proteínas que desempenham papel fundamental no
 152 processo de infecção por *M. phaseolina*, alguns metabólitos com atividade fitotóxica
 153 já foram identificados e contribuem no processo infeccioso (BANDARA et al., 2018,
 154 KHAN et al., 2017, SINHA et al., 2021). Esses compostos estão concatenados a
 155 seguir.

156 **Tabela 2:** Compostos produzidos por *M. phaseolina*.

Proteínas	Metabólitos
Amilase	Ácido faseolínico
β -glucosidase	Botriodiplodina
Catalase	Faseolinona
Endoglucanase	Fasesociclopentanona A
Hidrolases	Fasesociclopentanona B
Lipase	Guignardona A
Protease	Isoasperlina
Superóxido dismutase	Macrofominol
Xilanases	Meleína

157 **Fonte:** O próprio autor.

158 **Referências:** BHATTACHARYA et al., 1987; MAHATO et al. 1987; BHATTACHARYA et al., 1994;
159 TRIGOS et al. 1995; RAMOS-SANTOS et al., 2014; SARKAR et al., 2014; KHAN et al., 2017;
160 BANDARA et al., 2018; LAI & LIOU, 2018; ABBAS et al., 2020; KHAMBHATI et al., 2020; LU et al.,
161 2020; SALVATORE et al., 2020; SINHA et al., 2021.

162

163 Quando em contato com o hospedeiro, estes metabólitos podem apresentar
164 atividade de supressão da divisão celular, ativação ou inibição da respiração,
165 alterações bioquímicas (síntese ou transporte de compostos), danos às membranas
166 celulares ou até mesmo mimetizar alguns fitohormônios (OTANI, KOHMOTO,
167 KODAMA 1995; BERESTETSKIY 2008).

168

169 **2.2.2 *Rhizoctonia solani***

170 O fungo *Rhizoctonia solani* pertencente ao filo *Basidiomycota*, classe
171 *Agaricomycetes*, família *Ceratobasidiaceae*, é classificado como necrotrófico e
172 responsável por danos a uma ampla gama de culturas como soja, algodão, canola,
173 trigo, beterraba, batata e alecrim (NAGARAJ et al., 2017).

174 Devido a sua alta patogenicidade, *R. solani* pode causar tombamento pré e
175 pós-emergência, ferrugem da bainha, podridão da raiz, podridão do colo, cancro do
176 caule, podridão da coroa, podridão de botões e frutos e ferrugem da folhagem
177 (EMBRAPA, 1999; NAGARAJ et al., 2017).

178 A infecção nos tecidos vegetais ocorre por meio de hifas especializadas ou
179 estruturas de infecção, conhecidas como apressórios lobados. A penetração da
180 cutícula ocorre através da pressão mecânica aliada a degradação do tecido
181 hospedeiro, causada por enzimas como: celobiose desidrogenase, β -xilanase, β -
182 glucanase, β -glucosidase, cutinase e glicosil transferase (GARCIA et al., 2006).

183 Além das enzimas, durante a infecção, há a secreção de fitotoxinas como: ácido
184 3-metiltiopropiônico e ácido 3-metiltioacrílico, componentes determinantes quanto a
185 patogenicidade e progressão da doença (VERWAAIJEN et al., 2017).

186

187 **2.3 Controle biológico**

188 O controle biológico é um fenômeno natural que consiste na regulação dos
189 organismos por inimigos naturais, pode ser classificado como um fenômeno dinâmico
190 que sofre influência de fatores climáticos, da disponibilidade de alimentos e da
191 competição (VAN DEN BOSCH et al, 1982).

192 Atualmente o controle biológico é empregado como uma metodologia crescente
193 no mundo e uma estratégia eficaz no controle de pragas agrícolas, essa inovação
194 trouxe consigo o incentivo para o uso de bioinsumos (MAPA, 2022).

195 Os bioinsumos, são definidos como produto, processo ou a tecnologia de
196 origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no
197 armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de
198 produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no
199 crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas,
200 de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os
201 processos físico-químicos e biológicos, esses, são produzidos a partir de
202 microrganismos ou moléculas produzidas por eles que atuam de forma benéfica para
203 controle de doenças ou como fertilizantes (MAPA, 2022).

204 Atualmente no Brasil, estão registrados 636 inoculantes e 617 produtos para
205 controle de pragas, dentre estes, apenas 94 são agentes biológicos de controle. Com
206 relação a bioinsumos produzidos a partir de microrganismos, os registros indicam 295
207 inseticidas, 114 fungicidas, 78 nematicidas e 5 bactericidas (MAPA, 2024).

208 2.3.1 *Bacillus*

209 Dentre os 114 fungicidas microbiológicos registrados no Brasil, 50 deles são
210 produzidos a partir *Bacillus*, gênero pertence à família *Bacillaceae*, estes, apresentam
211 formato de bastonetes, são gram-positivos, facultativos aeróbios, catalase positivos e
212 são produtores de endósporos (MADIGAN et al., 2010).

213 A vasta utilização deste gênero bacteriano na produção de fungicidas se deve
214 ao aparato genético e grande estabilidade. Essas características estão intimamente
215 relacionadas a capacidade de formação de endósporos, a produção de metabólitos e
216 promoção de crescimento em plantas, o que torna o gênero *Bacillus* uma alternativa
217 promissora (YOO et al., 2006; RÜCKERT et al., 2011; JI et al., 2013; BLEICH et al.,
218 2015; ZHANG et al., 2015).

219 Entre os 50 bioinsumos compostos por *Bacillus* ou por moléculas produzidas
220 por eles, 16 deles são referentes a *B. velezensis*. Essa espécie foi isolada pela
221 primeira vez na foz do rio Vélez em Málaga (sul da Espanha) e descrita por Ruiz-
222 García et al. 2005, como uma bactéria Gram positiva que se desenvolve na faixa de
223 temperatura de 15 a 45 °C e faixa de pH de 5,0 a 10,0 (MAPA, 2024).

224 A cepa de *B. velezensis* CMRP 4490 utilizada no presente trabalho, após
225 sequenciada apresentou um genoma estimado em 3.996.396 pb. Foram identificados
226 13 clusters relacionados à síntese de moléculas com atividade antifúngica, dentre
227 eles, 8 apresentaram agrupamentos de genes biossintéticos já descritos ligados à
228 síntese de: surfactina, butirósina A/B, macrolactina H, bacileno, fengicina, difficidina,
229 bacilibactina e bacilisina (TEIXEIRA, G. M. et al., 2020).

231 **2.3.2 Compostos antifúngicos**

232

233

234

235

236

237

Vários compostos apresentam propriedade de inibição de microrganismos, desde lipopeptídeos não ribossomais até algumas proteínas, as quais são produzidas por uma grande variedade de organismos como as bactérias, espécies de vertebrados, invertebrados, plantas e fungos (WILLIAM et. al. 1989; WONG et al. 2008).

238

239

240

241

O metabolismo secundário é caracterizado pela produção de compostos dependentes dos produtos advindos do metabolismo primário, essa via metabólica é responsável pela produção de moléculas que podem ou não serem ativas (VINING, 1986; SPECIAN et al., 2014).

242

243

244

245

Com uma ampla gama de funções, os metabólitos secundários podem atuar como defesa contra patógenos, herbívora, proteção contra raios ultravioletas, tolerância à dessecação, transporte de metais entre outros (WHITTAKER, 1975; DETHIER, 1954; FRAENKEL, 1959; STAMP, 2003;).

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

Um exemplo da ação de proteínas antifúngicas na natureza, são as proteínas análogas a taumatina, essas estão presente em *Thaumatococcus daniellii* e podem ser encontradas no oeste da África. Embora a proteína taumatina e sua proteína análoga sejam semelhantes estruturalmente, não compartilham das mesmas características, já que a taumatina não apresenta atividade antifúngica (HO et al. 2007). Estas proteínas análogas são produzidas por algumas monocotiledôneas como cevada, trigo, sorgo e aveia, e tem capacidade de inibir o crescimento micelial dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicol* (HO et al. 2007; WONG et al. 2008).

256 2.3.3 Lipopeptídeos

257 A literatura indica que microrganismos do gênero *Bacillus* são capazes de
258 produzir metabólitos secundários pela via NPSP- *Nonribosomal Peptide Syntasis*
259 *Pathway* ou pela via do PKS - *Polyketide Synthase* (WONG et al., 2008; WONG &
260 NG, 2009; BENITEZ et al. 2012;). Alguns dos compostos identificados e
261 caracterizados são: iturina A, bacilomicina, bacilopeptina, surfactina e fengicina.

262 A família das iturinas apresenta uma estrutura de pentapeptídeo ou
263 heptapeptídeo cíclico com uma cadeia de ácido graxo contendo de 14 a 17 átomos de
264 carbono. Destacam-se as iturinas A, C, D e E, bacilomicina D, F, L, bacilopeptina e
265 mycosubtilina (MAGET-DANA & PTAK 1990; ALVAREZ, 2011; JEMI et al., 2017).

266 O mecanismo de ação das moléculas de iturina ocorre quando penetram a
267 membrana citoplasmática da célula-alvo e desorganizam a bicamada lipídica ativando
268 as fosfolipases. Dentro da membrana, elas formam estruturas oligoméricas
269 (agregados de lipopeptídeos ou agregados do complexo lipopeptídeo-fosfolípido) que
270 formam poros e aumentam com o passar do tempo e permitem o vazamento de K⁺
271 intracelular (MAGET-DANA & PTAK, 1990).

272 A família das surfactinas refere-se às moléculas formadas por um
273 heptapeptídeo ligado a uma cadeia de ácido graxo contendo entre 13 e 16 átomos de
274 carbono. Essas moléculas promovem a alteração na membrana fosfolipídica devido
275 às interações fortes que estabelecem com a membrana, além de serem poderosos
276 surfactantes, por terem a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72
277 para 27 mN/m em uma concentração tão baixa quanto 0,005%, além de apresentar
278 potente atividade antiviral, antitumoral, anticoagulante e bem como inibições
279 enzimáticas (YAN et al., 2012; MNIF & GHRIBI, 2015).

280 A família das fengicinas é composta por lipodecapeptídios cíclicos ligados a
281 uma cadeia de ácido graxo contendo entre 14 e 18 átomos de carbono (saturados ou
282 insaturados), apresentando uma forte ação contra fungos filamentosos. As fengicinas
283 diferem das iturinas e surfactinas pela presença de aminoácidos incomuns, como
284 ornitina e alo-treonina. A variação da posição 6 no anel peptídico em Ala- Val permite
285 diferenciar as estruturas das moléculas pertencentes à família da fengicina em
286 fengicina A e B e plipastatina A e B (ONGENA et al., 2005; ALVAREZ, 2011; MNIF &
287 GHRIBI, 2015).

288

289 **3 MATERIAL E MÉTODOS**

290 **3.1 Microrganismos**

291 A bactéria utilizada neste trabalho foi uma linhagem da espécie *B. velezensis*
292 CMRP 4490, originalmente isolada de um solo localizado a 23°19'26,2"S,
293 51°11'50,5"W, na Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil. A cepa
294 foi mantida no Laboratório de Biotecnologia Microbiana da UEL e depositada como
295 cepa CMRP 4490 nas "Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense (CMRP)" da
296 Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

297 Os fitopatógenos utilizados nos experimentos *in vitro* foram *M. phaseolina* e *R.*
298 *solani*, ambos se encontram estocados no Laboratório de Biotecnologia Microbiana -
299 LABIM da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil.

300300

301 3.2 Produção dos metabólitos

302 Para ativação da linhagem proveniente do banco de células, o isolado foi
303 inoculado em placas de ágar Luria-Bertani (LB - Acumedia, USA) e incubados em
304 estufa a 28°C por 24 horas, posteriormente foram feitos repiques a partir de colônia
305 isoladas, e incubados em meio LB a 28 °C por 18 horas. Após crescimento, colônias
306 isoladas foram suspensas em salina e ajustadas na concentração 0,5 da escala
307 nefelométrica de *Mc Farland*, correspondendo a uma concentração de $1,5 \times 10^8$
308 unidades formadoras de colônias (UFC). Para o preparo da cultura iniciadora (CI)
309 300ul da suspensão salina foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 100 ml
310 contendo 30 ml de meio formulado: g L⁻¹: glicose 20,00; triptona 12,40; NaCl 5,00;
311 K₂HPO₄ 3H₂O 1,50; MnSO₄ H₂O 0,04; FeSO₄ 7H₂O 1,67; MgCl₂ 6H₂O 1,22; pH 7,00 -
312 7.20 (Patente BR 102020013481 7), os quais foram incubados a 28°C, 200 rpm
313 (agitador orbital Thoth 6430B, Brasil), por 18h.

314 Para a realização da fermentação líquida submersa, uma alíquota de 1% (v/v)
315 proveniente da cultura iniciadora foi transferida para o Biorreator Applikon (Ez-Control-
316 Holanda) contendo 2000 ml do mesmo meio formulado, sob agitação de 1000 rpm à
317 28° C e 0,5 VVM de ar.

318 Após inoculado, a dorna foi acoplada ao Biorreator Applikon (Ez-Control-
319 Holanda) onde monitorou-se a variação de pH, oxigênio dissolvido, temperatura e
320 controlado o nível de espuma.

321 Para a obtenção do Sobrenadante Livre de Células (SLC), o fermentado foi
322 centrifugado por 15 min a 8860 x g (Hitachi, CR21G Himac), congelado e liofilizado,
323 obtendo o extrato bruto, material seco ri

325 **3.3 Contagem de células viáveis**

326 A determinação da quantidade de unidades formadoras de colônias foi
327 realizada por meio da diluição seriada, a partir de um tubo de ensaio contendo 9 ml
328 de solução salina e 1ml do fermentado. As amostras referentes a cada uma das
329 diluições foram plaqueadas por meio da técnica de espalhamento com Drigalsky em
330 placas de Petri de 90 mm contendo meio TSA (*Trypticase Soy Agar*) solidificado
331 (MORAES, R., 1993).

332 As placas foram incubadas à 25°C e analisadas após 24 e 36 horas, as
333 contagens foram delimitadas como válidas quando entre 30 e 300 colônias.

334 **3.4 Tratamento térmico**

335 Os mesmos tubos de ensaio utilizados na contagem de células viáveis foram
336 aquecidos a 80°C durante 15 minutos em banho maria e as amostras referentes a
337 cada uma das diluições foram plaqueadas por meio da técnica de espalhamento com
338 Drigalsky em placas de Petri de 90 mm contendo meio TSA (*Trypticase Soy Agar*)
339 solidificado (MORAES, R., 1993).

340 As placas foram incubadas à 25°C e analisadas após 24 e 36 horas, as
341 contagens foram delimitadas como válidas quando entre 30 e 300 colônias.

342342

343 **3.5 Teste de poço-difusão em ágar**

344 Os testes de poço-difusão foram realizados no período de 72:00h em placas
345 de Petri contendo o meio de cultivo BDA (Ágar Batata Dextrose) para o
346 acompanhamento da produção metabólica e determinação da atividade antifúngica
347 do SLC contra *M. faseolina* e *R. solani*.

348 O spot de 9 mm do fungo antagonista foi depositado ao centro da placa e de
349 forma equidistante foram dispostos os poços de 9 mm de diâmetro, nesses foram
350 depositados 200µl do Sobrenadante Livre de Células ainda líquido, as amostras foram
351 esterilizadas por filtração em membrana de polietersulfona (PES) 0,22 µm

352 **3.6 Extração dos metabólitos**

353 **3.6.1 Extração em Fase Sólida (EFS) do Extrato Bruto (EB)**

354 O Sobrenadante Livre de Células (SLC) após ser liofilizado, foi denominado
355 como Extrato Bruto (EB). A partir do EB foi realizada a primeira Extração em Fase
356 Sólida (EFS ou *Solid Phase Extraction* - SPE) utilizando cartuchos de Sílica de Fase
357 Normal (EFS-N), a partir de 1 g do EB adsorvida em 325 mg de sílica gel (0,063-
358 0,200m), triturados com auxílio de almofariz e pistilo e inseridos em cartuchos,
359 contendo 750 mg de sílica gel, como fase móvel foi utilizado 250 ml de metanol para
360 a extração dos compostos polares. O extrato orgânico obtido a partir desta técnica foi
361 denominado EFS do EB.

362362

363 **3.6.2 Precipitação ácida (PA) em pH 2,0**

364 Para a realização da precipitação ácida foi adicionado ao SLC ainda líquido,
365 ácido clorídrico à 6M ajustando a solução até o pH 2,0, o frasco foi mantido a 4º C
366 durante a noite para a precipitação completa dos lipopeptídeos. Após o período de
367 *overnight*, a solução foi centrifugada durante 15 minutos a 12.000 rpm. Após
368 centrifugação, o precipitado e sobrenadante foram ressuspensas em água e o pH
369 ajustado à 7,5.

370370

371 **3.6.3 Precipitação ácida (PA) em pH 4,0**

372 Para a realização da segunda precipitação ácida, foi adicionado ao SLC ainda
373 líquido, ácido clorídrico à 6M ajustando a solução até o pH 4,0, o frasco foi mantido a
374 4º C durante a noite para a precipitação completa dos lipopeptídeos. Após o período
375 de *overnight*, a solução foi centrifugada durante 15 minutos a 12.000 rpm. Após
376 centrifugação, o precipitado e sobrenadante foram ressuspensas em água e o pH
377 ajustado à 7,5.

378378

379 **3.6.4 EFS dos Precipitados (P) obtidos na Precipitação Ácida (PA)**

380 Com o objetivo de otimizar a extração foram aplicados métodos de forma
381 conjunta, aliando a EFS à PA. Os Precipitados (P) resultantes da PA foram extraídos
382 novamente pela EFS, a partir de 1 g do Precipitado (P) adsorvidos em 325 mg de sílica
383 gel (0,063-0,200m), triturados com auxílio de almofariz e pistilo e inseridos em
384 cartuchos, contendo 750 mg de sílica gel, como fase móvel foi utilizado 250 ml de
385 metanol para a extração dos compostos polares.

386 Para a retirada dos solventes, as amostras coletadas: **EFS do Precipitado em**
387 **pH 2,0** e **EFS do Precipitado em pH 4,0**, foram concentradas em rotaevaporador
388 (Fisatom, 801) ressuspensas em água, congeladas e liofilizadas.

389389

390 **3.7 Teste de difusão em ágar Spot on The Lawn (STL)**

391 A qualificação da possível atividade inibitória foi realizada por meio de testes
392 *Spot on lawn* contra *M. phaseolina* e *R. solani*. Em placas de Petri de 90 mm de

393 diâmetro com meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA) foram depositados
394 Spots de 9 mm do fungo antagonista ao centro da placa e de forma equidistante foram
395 dispostas 10µl as amostras de interesse na mesma concentração.

396 Foram testadas duas concentrações: 500µg/10µl e 250ug/10µl, as placas foram
397 incubadas com fotoperíodo de 12 horas em incubadoras do tipo BOD a 25 °C, durante
398 5 a 7 dias e os diâmetros dos halos de inibição foram medidos em milímetros (mm).

399399

400 **3.8 Concentração Inibitória mínima (CIM)**

401 Para determinar a concentração inibitória mínima da amostra mais ativa, foi
402 realizada uma diluição seriada do extrato em tubos contendo água deionizada estéril,
403 após a diluição, 1 ml de cada amostra foi incorporado aos 9 ml de meio BDA em placas
404 de Petri (60mm), resultando nas concentrações: 250 ug/ml; 125 ug/ml; 62,5 ug/ml;
405 31,2 ug/ml; 15,6 ug/ml e 7,8 ug/ml, estas concentrações já são as concentrações dos
406 extratos incorporados ao meio de cultura.

407 Plugs de 5 mm de diâmetro com o micélio de *M. phaseolina* obtidos de uma
408 cultura de 5 dias, foram depositados no centro das placas, após solidificado. O
409 crescimento micelial foi avaliado em 24:00, 48:00 e 72:00 horas de incubação a 25°C
410 e a porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial (ICM) calculada de acordo com
411 Yahyazadeh et al., (2008):

412412

$$413 \text{ ICM (\%)} = [(C - T)] / C] \times 100$$

414

415 Onde C (mm) é o diâmetro médio da colônia no controle e T (mm) é o diâmetro
416 médio da colônia de cada tratamento. A concentração inibitória mínima foi a menor
417 concentração que inibiu completamente o crescimento fúngico.

418 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

419 4.1 Contagem de células viáveis e tratamento térmico

420 As diluições foram realizadas com o intuito de verificar a pureza do fermentado
421 com relação a contaminantes e determinar a concentração de células viáveis obtidas
422 após a fermentação líquida submersa.

423 Por meio do plaqueamento e contagem, foram obtidas colônias puras de
424 mesmas características macromorfológica e em quantidades satisfatórias,
425 demonstrando boa relação entre o metabolismo da cepa e o meio de cultura escolhido.

426 Através do estresse térmico causado pelo aquecimento das diluições e
427 plaqueamento, foi confirmada a capacidade do microrganismo de se diferenciar em
428 endósporos, a contagem de colônias em ambos os testes estão na tabela a seguir.

429429

430 **Tabela 3:** Contagem de células viáveis e endósporos com 24 horas e 36 horas.

Teste	Diluição	24h	36h
Unidades Formadoras de Colônia	-6	$4,1 \times 10^8$	$5,4 \times 10^8$
Endósporos	-6	$3,2 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$

431 **Fonte:** o próprio autor

432

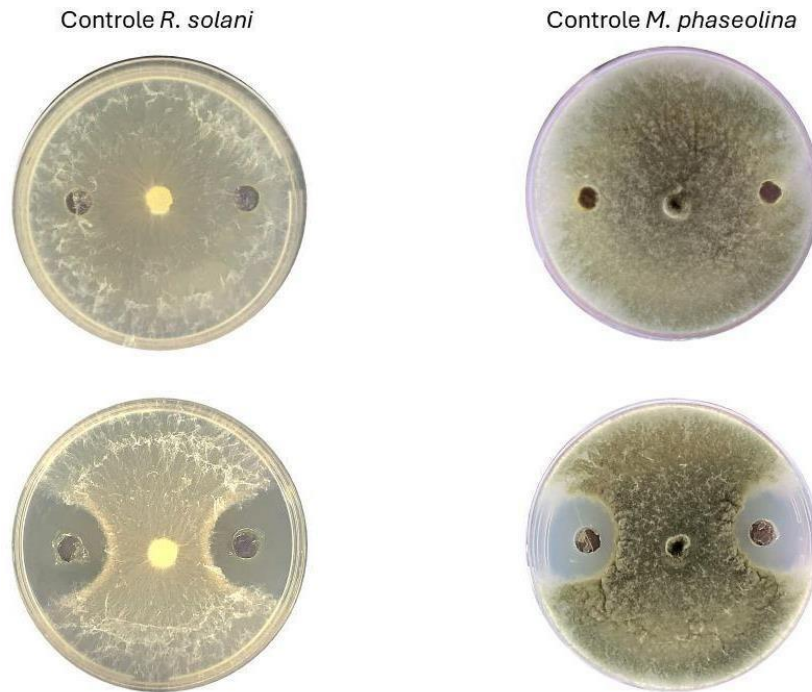
433 4.2 Teste de poço difusão em ágar

434 Após a fermentação líquida submersa foi realizado o teste de poço-difusão com
435 o sobrenadante livre de células, constatando a presença de metabólitos secundários
436 com ação antifúngica. Os halos resultantes foram medidos e atingiram $27,55 \pm 0,74$
437 mm contra *M. phaseolina* e $28,25 \pm 0,85$ mm contra *R. solani*.

438

439
440

Figura 1: Teste de poço difusão utilizando 200µl de sobrenadante livre de células (líquido) contra os fitopatógenos *M. phaseolina* e *R. solani*.



441

Fonte: O próprio autor.

442

443

As extrações resultaram em diferentes rendimentos de acordo com a metodologia utilizada, obteve-se os seguintes valores a partir das amostras ativas:

445

446

Tabela 4: Rendimento dos extratos liofilizados.

Extrações	Peso matéria prima	Peso extrato liofilizado (g)	Porcentagem (%)
P. pH 2,0	100 ml (SLC)	0,490	-
P. pH 4,0	100 ml (SLC)	0,530	-
P. pH 4,0 EFS	1 g (PELLET)	0,601	60,1
EFS	1 g (EB)	0,415	41,5

447

Fonte: O próprio autor.

448 **Legenda: P.pH 2,0:** Precipitado da precipitação ácida em pH 2,0/ **P.pH 4,0:** Precipitado da precipitação
 449 ácida em pH 4,0/ **P. pH 4,0 EFS:** Precipitado em pH 4,0 da precipitação ácida após extração em fase
 450 sólida/ **EFS:** Extração em fase sólida do extrato bruto.

451

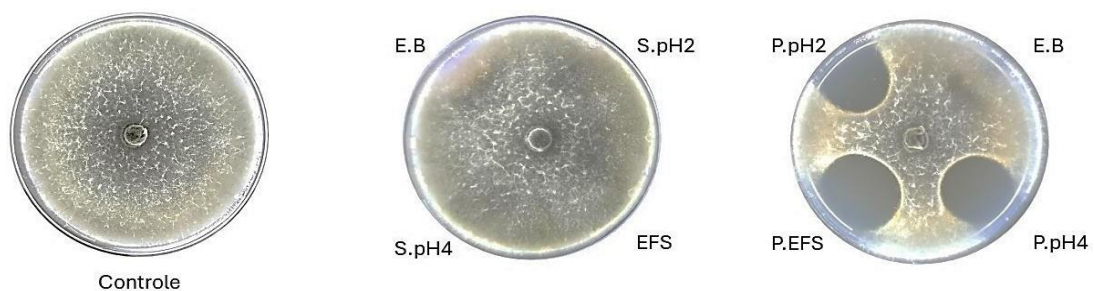
452 4.3 Teste de difusão em ágar Spot On The Lawn (SOTL)

453 Por meio do teste STL contra *M. phaseolina* utilizando as extrações em
 454 concentração 250 ug/ 10µl ou 25 mg/ml, foi observada atividade antifúngica nas
 455 amostras: precipitado (PA) em pH 2,0 (**P.pH 2,0**), precipitado (PA) em pH 4,0 (**P.pH**
 456 **4,0**) e precipitado em pH 4,0 (PA) após a extração em fase sólida (**P.EFS**), as zonas
 457 de inibição foram de 21,9 mm a 26,2 mm respectivamente.

458 As amostras: extrato bruto (**EB**), extração em fase sólida do extrato bruto (**EFS**),
 459 sobrenadante da precipitação ácida em pH 2,0 (**S.pH2**) e sobrenadante da
 460 precipitação ácida em pH 4,0 (**S.pH4**), não apresentaram nenhuma atividade. O
 461 resultado pode ser observado na figura 2 e as medidas dos halos na tabela 6.

462

463 **Figura 2:** Teste SOTL utilizando extratos contra *M. phaseolina* em concentração de 250ug/10µl.



464 **Fonte:** O próprio autor.

465 **Legenda: EB:** extrato bruto (SLC liofilizado)/ **S.pH2:** sobrenadante da precipitação ácida em pH 2,0/
 466 **S.pH4:** sobrenadante da precipitação ácida em pH 4,0/ **EFS:** Extração em fase sólida do extrato bruto/
 467 **P.pH 2,0:** Precipitado da precipitação ácida em pH 2,0/ **P.pH 4,0:** Precipitado da precipitação ácida em
 468 pH 4,0/ **P.EFS:** Precipitado em pH 4,0 da precipitação ácida após extração em fase sólida.

469 **Tabela 5:** Medida em diâmetro dos halos no teste *spot on the lawn* contra *M. phaseolina* na
470 concentração de 250 ug/10µl.

	Extrações	Medida dos halos em mm (250ug/10µl)	Desvio padrão
471471			
472472			
473473	EB	00,0	-
474474	EFS	00,0	-
	S_pH2	00,0	-
475475	S_pH4	00,0	-
	P_pH2	21,9	1,833
476476	P_pH4	22,3	1,389
	P_EFS	26,2	1,177
477477	C	00,0	-

478 **Fonte:** O próprio autor.

479 **Legenda:** **EB:** extrato bruto/ **EFS:** extração em fase sólida/ **S.pH2:** sobrenadante da precipitação ácida
480 em pH 2,0/ **S.pH4:** sobrenadante da precipitação ácida em pH 4,0/ **EFS:** Extração em fase sólida/ **P.pH**
481 **2,0:** Precipitado da precipitação ácida em pH 2,0/ **P.pH 4,0:** Precipitado da precipitação ácida em pH
482 4,0/ **P.EFS:** Precipitado em pH 4,0 da precipitação ácida após extração em fase sólida/ **C:** controle.

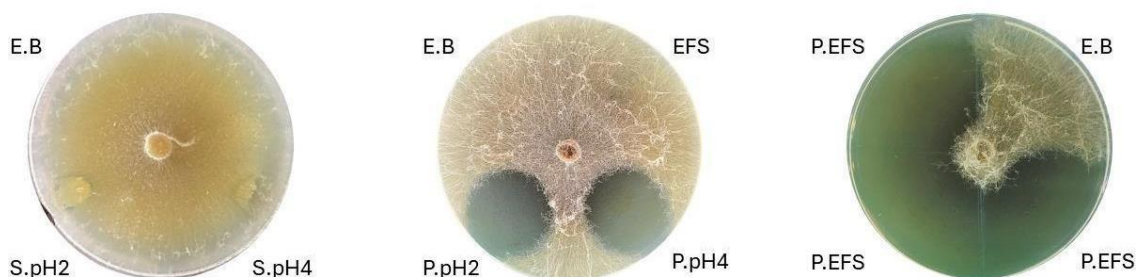
8
2

4834
8
3

484 Em maior concentração (500ug/10µl ou 50mg/ml) contra *R. solani*, foi
485 constatada atividade antifúngica nos precipitados provenientes da precipitação ácida,
486 como mostra a figura 3 e tabela 7. Os sobrenadantes resultantes da precipitação, bem
487 como o extrato bruto e extração em fase sólida não apresentaram inibição alguma
488 nessa concentração.

489489

490 **Figura 3:** Teste SOTL utilizando extratos contra *R. solani* em concentração de 500 ug/10µl.



491 **Fonte:** O próprio autor.

492 **Legenda: EB:** extrato bruto (SLC liofilizado)/ **EFS:** extração em fase sólida/ **S.pH2:** sobrenadante da
 493 precipitação ácida em pH 2,0/ **S.pH4:** sobrenadante da precipitação ácida em pH 4,0/ **EFS:** Extração
 494 em fase sólida do EB/ **P.pH 2,0:** Precipitado da precipitação ácida em pH 2,0/ **P.pH 4,0:** Precipitada
 495 precipitação ácida em pH 4,0/ **P.EFS:** Precipitado em pH 4,0 da precipitação ácida após extração em
 4964 fase sólida.

9
6

4974
9
7

498 **Tabela 6:** Medida em diâmetro dos halos no teste SOTL contra *R. solani* em concentração de 500
 499 ug/10µl.

Extrações	Medida dos halos em mm	Desvio padrão
EB	00,0	-
EFS	00,0	-
S_pH2	00,0	-
S_pH4	00,0	-
P_pH2	24,5	0,984
P_pH4	26,5	0,416
P_EFS	30,0	0,866
C	00,0	-

500 **Fonte:** O próprio autor.

501 **Legenda: EB:** extrato bruto (SLC liofilizado)/ **EFS:** extração em fase sólida/ **S.pH2:** sobrenadante da
 502 precipitação ácida em pH 2,0/ **S.pH4:** sobrenadante da precipitação ácida em pH 4,0/ **EFS:** Extração
 503 em fase sólida do EB/ **P.pH 2,0:** Precipitado da precipitação ácida em pH 2,0/ **P.pH 4,0:** Precipitado da
 504 precipitação ácida em pH 4,0/ **P.EFS:** Precipitado em pH 4,0 da precipitação ácida após extração em
 505 fase sólida.

506506

507 Por meio do tamanho da zona de inibição nos testes posteriores foi possível
 508 realizar uma inferência com relação a eficiência entre as metodologias, foi observada
 509 uma pequena diferença entre a atividade antifúngica do **precipitado em pH 4** e
 510 **precipitado em pH 2**, dada, provavelmente, pela estabilidade das moléculas quando
 511 expostas ao pH mais ácido. Essa exposição pode ocasionar danos ou destruição das
 512 moléculas ativas, refletindo negativamente no potencial antifúngico das extrações.

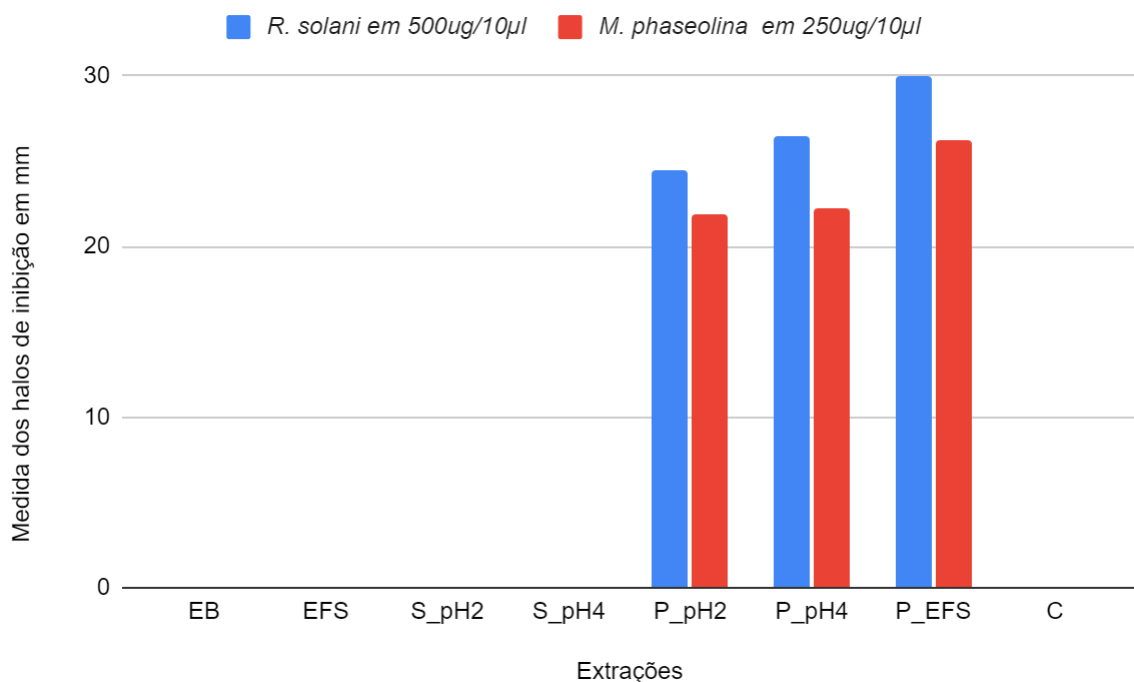
513 A amostra **precipitada em pH 4,0 após EFS**, destacou-se apresentando a
 514 maior zona de inibição contra ambos os patógenos, como mostra o gráfico 1.

515 Para a separação de um lipopeptídeo extracelular do meio livre de células, a
 516 precipitação ácida é a metodologia mais utilizada. Ao reduzir o pH do meio, as
 517 moléculas se carregam positivamente, diminuindo a eficácia da sua região hidrofílica,
 518 havendo sua agregação e insolubilidade e, por consequência, o tensoativo precipita
 519 na forma sólida. Contudo, a cauda de ácido graxo contribui na solubilidade em
 520 solventes orgânicos, assim, esse método em geral, é seguido de uma extração com
 521 solvente orgânico, justificando a maior atividade na amostra extraída utilizando essa
 5225 metodologia (YANG, H. et al, 2015).

2
2

Gráfico 1: Média do diâmetro dos halos obtidos a partir dos extratos no teste *spot on the lawn* contra *M. phaseolina* e *R. solani*.

5235
2
3
5245
2
4
5255
2
5



Fonte: O próprio autor.

5265
2
6
5275
2
7

528 **Legenda: EB:** extrato bruto/ **EFS:** extração em fase sólida/ **S.pH2:** sobrenadante da precipitação ácida
529 em pH 2,0/ **S.pH4:** sobrenadante da precipitação ácida em pH 4,0/ **EFS:** Extração em fase sólida/ **P.pH**
530 **2,0:** Precipitado da precipitação ácida em pH 2,0/ **P.pH 4,0:** Precipitado da precipitação ácida em pH
531 4,0/ **P.EFS:** Precipitado em pH 4,0 da precipitação ácida após extração em fase sólida/ C: controle.

532 4.4 Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

533 Com o intuito de identificar a concentração mínima inibitória, o teste CIM foi
 534 realizado e na figura 4 são apresentados os resultados obtidos, as placas contêm
 535 diferentes concentrações do extrato mais ativo (PELLET+EFS) nas concentrações:
 536 250 ug/ml; 125 ug/ml; 62,5 ug/ml; 32,1 ug/ml; 15,6 ug/ml; 7,8 ug/ml.

537 A placas em concentração 250 ug/ml atingiram 100% de inibição contra *M.*
 538 *phaseolina* durante as 72 horas, a segunda diluição mais concentrada (125 ug/ml),
 539 apresentou inibição total nas primeiras 24 horas, contudo, a partir das 48 horas houve
 540 uma diminuição na performance de controle, atingindo 79,8%.

541 Nas placas em concentração de 62,5 ug/ml foi possível observar o atraso no
 542 crescimento do fungo e inibição de 55,3 %, já entre as outras diluições não houve
 543 inibição ou controle significativo.

544544

545 **Tabela 7:** Medida em diâmetro do fungo *M. phaseolina* durante o teste de concentração mínima
 546 inibitória.

Concentração do extrato precipitado em pH 4,0 + EFS (µg/mL)	% inibição 24h	% inibição 48h	% inibição 72h
250	100,0	100,0	100,0
125	100,0	82,6	79,8
62,5	36,6	58,3	55,3
31,25	2,4	47,9	35,8
15,62	2,4	20,1	0,0
7,81	2,4	11,5	0,0

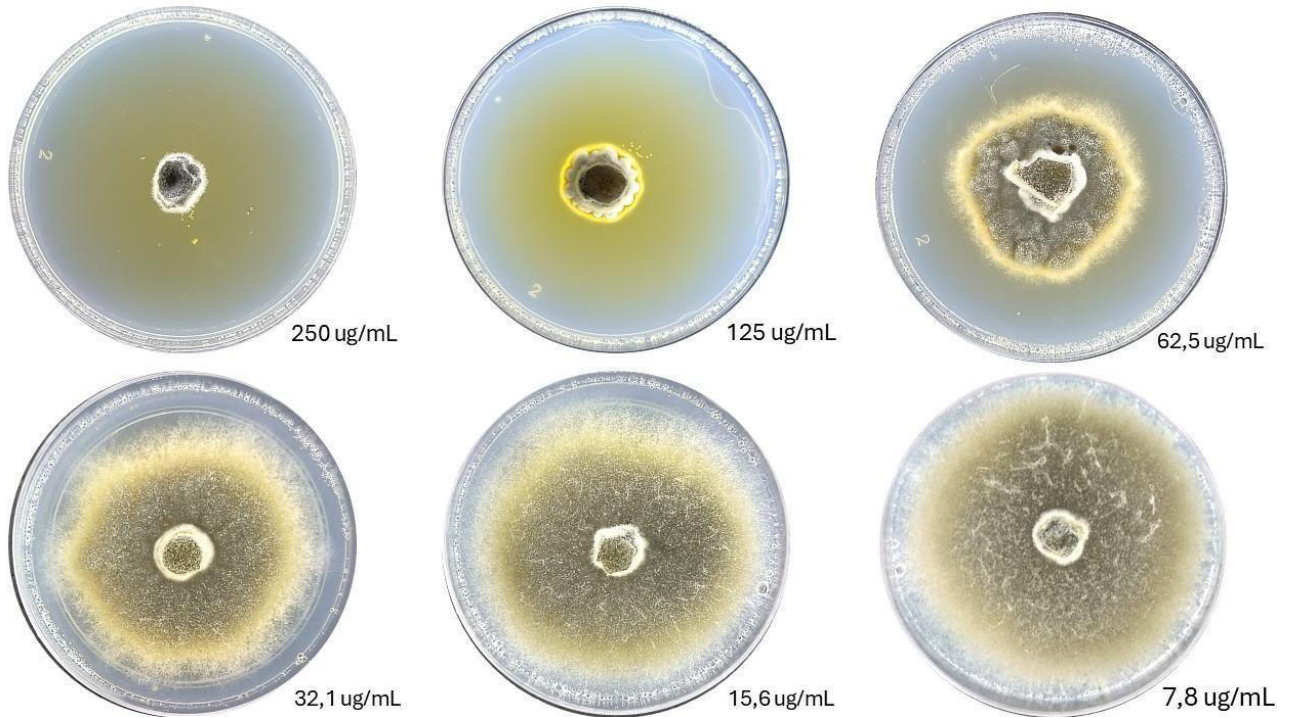
547 **Fonte:** O próprio autor.

548548

549549

550550

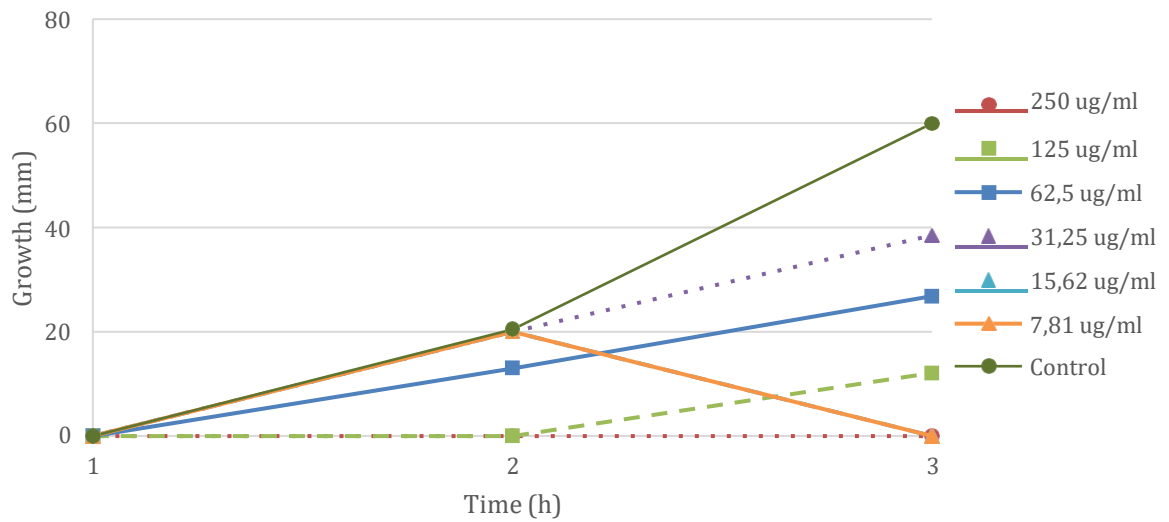
551 **Figura 4:** Teste de concentração mínima inibitória com 72 horas de incubação contra *M. phaseolina*.



552 **Fonte:** O próprio autor.

553

554 **Gráfico 2:** Medidas do fungo *M. phaseolina* ao longo de 72 horas referentes ao teste de
555 concentração inibitória mínima .



556 **Fonte:** O próprio autor.

557

558 5. CONCLUSÕES

559 O presente estudo buscou produzir e extrair os compostos produzidos por *B.*
 560 *velezensis* CMRP 4490, ressaltando o potencial antifúngico dos metabolitos
 561 produzidos. Os dados dos testes *in vitro* foram indicadores de que os compostos ativos
 562 contra *M. phaseolina* e *R. solani* podem ser eficientemente extraídos por diversas
 563 metodologias, sendo que entre elas, a mais eficiente foi a precipitação ácida seguida
 564 de extração em fase sólida. Além disso, foi possível concluir que a concentração
 565 inibitória mínima da amostra mais ativa contra *M. phaseolina* está entre 250ug/ml e
 566 125ug/ml, entretanto, são necessários mais testes e metodologias de purificação para
 567 separar, identificar e avaliar a atividade das moléculas antifúngicas individualmente.

568 REFERÊNCIAS

- 569 ABBAS, HK, BELLALLOUI, N., BUTLER, AM, NELSON, JL, ABOU-KARAM, M., & SHIER, WT.
 570 **Respostas fitotóxicas da soja (*Glycine max* L.) à botryodiplodina, uma toxina produzida pelo**
 571 **fungo da doença da podridão do carvão, *Macrophomina phaseolina*.** *Toxina*, 12 (1), 25, 2020.
 572572
- 573 ALI S.S. & WAKTE P.S. Biofilm formation and siderophore production by *Pseudomonas Aeruginosa*
 574 isolated from wounds infection. **International Journal of New Technology and Research** 2(9): 20-
 575 23. 2016
- 576
- 577 AMAÍZ, L.et al.Evaluación del efecto antagonista de un consorcio bacteriano sobre *Rhizoctonia solani*
 578 Kühn en cultivos de arroz. **Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal**, v. 6 n. 1
 579 p. 19-30, 2017;
- 580
- 581 ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:
 582 <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos>. Acesso em
 583 24/04/2024.
- 584
- 585 BANDARA, YMAY, WEERASPORIYA, DK, LIU, S. e LITTLE, CR. O fungo necrotrófico *Macrophomina*
 586 *phaseolina* promove a suscetibilidade ao apodrecimento do carvão no sorgo granífero através de
 587 enzimas induzidas que degradam a parede celular do hospedeiro. **Fitopatologia**, 108 (8), 948-956,
 588 2018.
- 589
- 590 BHATTACHARYA, D., DHAR, TK, SIDDIQUI, KAI, & ALI, E. A inibição da germinação de sementes
 591 por *Macrophomina phaseolina* está relacionada à produção de faseolinona. **Jornal de Bacteriologia**
 592 **Aplicada**, 77 (2), 129-133, 1994.
- 593
- 594 BHATTACHARYA, G., DHAR, TK, BHATTACHARYYA, FK e SIDDIQUI, KA. Ação mutagênica da
 595 faseolinona, uma micotoxina isolada de *Macrophomina phaseolina*. **Jornal Australiano de Ciências**
 596 **Biológicas**, 40 (4), 349-353, 1987.
- 597
- 598 BHATTACHARYA, D., K. A. I. SIDDIQUI, and E Ali. "Phytotoxic Metabolites of *Macrophomina*
 599 *Phaseolina*." **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology** 22(1): 54-57, 1992.
- 600

- 601 BHATTACHARYA, DIPANWITA, TARUN K DHAR, and ESAHAK ALI. "An Enzyme Immunoassay of
602 Phaseolinone and Its Application in Estimation of the Amount of Toxin in *Macrophomina Phaseolina*
603 Infected Seeds." **Applied and Environmental Microbiology** 58(6): 1970-74, 1992.
- 604
605 BITANCOURT, A.A. **Uma nova doença do feijão**. O Biológico, v. 1, n. 2, p. 41, fev. 1935.
- 606
607 BOLTON, MELVIN D.; THOMMA, Bart PHJ; NELSON, Berlin D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de
608 Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular plant pathology**, v. 7, n. 1,
609 p. 1-16, 2006.
- 610
611 BORGES, A. F.; ALCÂNTARA NETO, F.; MATOS, K. S. BESERRA JÚNIOR, J. E. A.; MASSOLA
612 JÚNIOR, N. S.; MOREIRA, S. I.; MELO, M. P. de. Thielaviopsis ethacetica the etiological agent of
613 sugarcane pineapple sett rot disease in Brazil. **Trop. plant pathol.**v. 44, p. 460-467, 2019;
614 <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00298-9>.
- 615
616 BUAINAIN, A. M. GARCIA, J. R.; VIEIRA FILHO, J. E. R. A economia agropecuária do
617 Matopiba. **Estudos Sociedade e Agricultura**, v. 26, n. 2, p. 376-401, 2018.
- 618
619 BUTCHER RA, SCHROEDER FC, FISCHBACH MA, STRAIGHT PD, KOLTER R, WALSH CT,
620 CLARDY J. **The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus***
621 ***subtilis***. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jan 30;104(5):1506-9. doi: 10.1073/pnas.0610503104. Epub
622 2007. Jan 18. PMID: 17234808; PMCID: PMC1785240.
- 623
624 CAI Y., WANG R., AN M.-M. & LIANG B.-B. Iron Depletion prevents biofilm formation in *Pseudomonas*
625 *aeruginosa* through twitching mobility and quorum sensing. **Brazilian Journal of Microbiology** 41(1):
626 37-41. doi: 10.1590/S1517-83822010000100008, 2010.
- 627
628 CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **PIB Agronegócio de Cadeias -**
629 **2023**. 2024. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>.
630 Acesso em: 23 abril. 2024.
- 631
632 CHIARAMONTE, J. B.; MENDES, L. W.; MENDES, R. Rhizosphere Microbiome and Soil-Borne
633 Diseases. In: GUPTA, V. V. S. R.; SHARMA, A. K. (Org.) **Rhizosphere Biology: Interactions**
634 **Between Microbes and Plants**. Rhizosphere Biology. Springer, Singapore. p. 155-168.
635 2020https://doi.org/10.1007/978-981-15-6125-2_7.
- 636
637 CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. Fundamentos e desafios do manejo de doenças radiculares
638 causadas por fungos. In: Lopes, U. P. Michereff, S. J. (Org.). **Desafios do manejo de doenças**
639 **radiculares causadas por fungos**. 1ed. Recife: EDUFRPE, v. 1, p. 1-16.2018.
- 640
641 CORREIA, R. M. et al. Analysis of Robusta coffee cultivated in agroforestry systems (AFS) by ESI-FT-
642 ICR MS and portable NIR associated with sensory analysis, **Journal of Food Composition and**
643 **Analysis**, v. 94, 2020.7
- 644
645 DHINGRA, ONKAR D, and JAMES B SINCLAIR. **Biology and Pathology of *Macrophomina***
646 ***phaseolina***, 1978.
- 647
648 EMBRAPA. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil**
649 1999/2000. (226p) Embrapa Soja, Londrina (Documentos, 132), 1999.
- 650
651 ESPIGA Z, CAO X, ZHANG H. Produção de iturina A por *Bacillus velezensis* ND e suas
652 características de controle biológico. **J Microbiol Básico**. 2023; 63: 179-189 .
653 <https://doi.org/10.1002/jobm.202200473>
- 654
655 FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of United Nations. **Food and agriculture data**. 2024.
656 Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/> Acesso em: 23 abril. 2024.
- 657
658 FISHLOW, A. **Agricultura e indústria no Brasil**: inovação e competitividade. Brasília: IPEA, 2017.
- 659

- 660 GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J.; SALES J.R., R.JORDÁ, C.; BRUTON, B.D. Fungal pathogens
661 associated with melon plants collapse in Spain. **Bulletin**, 30: 169-173. 2000.
662
- 663 GARCIA, VG; ONCO, MP; SUSAN, VR *Biologia e sistemática da forma gênero Rhizoctonia*. **Período.**
664 **J. Agric. Res**, 4, 55-79, 2006.
665
- 666 GASQUES, J. G.; BASTOS, E. T.; VALDES, C.; BACCHI, M. R. P. Total factor productivity in Brazilian
667 agriculture. In: FUGLIE, K. O.; WANGS, S. L.; BALL, V. E. **Productivity growth in agriculture: an**
668 **international perspective**. Oxfordshire: CAB International, 2012.
669
- 670 GLICK R., GILMOUR C., TREMBLAY J., SATANOWER S., AVIDANO, DÉZIEL E., GREENBERG
671 E.P., POOLE K. & BANIN E. Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions
672 influences surface motility and biofilmformation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of**
673 **Bacteriology** 192(12): 2973-80. doi: 10.1128/JB.01601-09, 2010.
674
- 675 HALPERN, H. C.; BELL, A. A.; WAGNER, T. A.; LIU, J.; NICHOLS, R. L.; OLVEY, J.; WOODWARD,
676 J. E.; SANOGO, S.; JONES, C. A. CHAN, C. T.; BREWER, M.T. First Report of *Fusarium* Wilt of
677 Cotton Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum Race 4 in Texas, U.S.A. **Plant Disease**, v.
678 102, n. 2, p. 446, 2018.
679
- 680 HARRISON F. & BUCKLING A., Siderophore production and biofilm formation as linked social traits.
681 **The ISME Journal** 3:632-634. doi: 10.1038/ismej. 2009.
682
- 683 HENRIQUE, F. H.; CARBONELL, S. A. M.; ITO, M. F.; GONÇALVES, J. G. R.; SASSERON, G. R.;
684 CHIORATO, A. F. Classificação das raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli em
685 feijoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 74, n. 1, p. 84-92, 2015.
686
- 687 HERTLEIN G., MÜLLER S., GARCIA-GONZALEZ E., POPPINGA L., SÜSSMUTH R. D. &
688 GENERSCH E. Production of the catechol type siderophore bacillibactin by the honey bee pathogen
689 *Paenibacillus larvae*. **PLoS One** 9(9):e108272. doi:10.1371/journal.pone.0108272, 2014.
690
- 691 HILLOCKS, R. J.; WALLER, J. M. Soilborne diseases and their importance in tropical agriculture. In:
692 Hillocks, R. J. & Waller, J. M. (Eds.) **Soilborne Diseases of Tropical Crops**. Wallingford. CAB
693 International., p. 3-161997.
694
- 695 JOGAI AH, SUDISHA et al. Isolation and evaluation of proteolytic actinomycete isolates
696 as novel inducers of pearl millet downy mildew disease protection. **Scientific reports**,
697 v. 6, p. 30789, 2016.
698
- 699 KAJIMURA, Y., SUGIYAMA, M., & KANEDA, M. Bacilopeptinas, novos antibióticos lipopeptídicos
700 cíclicos de *Bacillus subtilis* FR-2. **O Jornal de Antibióticos**, 48(10), 1095
701 1103. doi:10.7164/antibióticos.48.1095. 1995
702
- 703 KHAN, AN, SHAIR, F., MALIK, K., HAYAT, Z., KHAN, MA, HAFEEZ, FY, & HASSAN, MN.
704 Identificação molecular e caracterização genética de cepas de *Macrophomina phaseolina* causadoras
705 de patogenicidade em girassol e grão de bico. **Fronteras em Microbiologia**, 8, 2017.
706
- 707 KHAMBHATI, VH, ABBAS, HK, SULTYOK, M., TOMASO-PETERSON, M., & SHIER, WT. Primeiro
708 relato da produção de micotoxinas e outros metabólitos secundários por *Macrophomina phaseolina*
709 (Tassi) Goid. isolados de soja (*Glycine max* L.) sintomáticos com doença da podridão do carvão.
710 **Jornal de Fungos**, 6(4), 332, 2020.
711
- 712 KAUR, SURINDER, GURPREET SINGH DHILLON, SATINDER KAUR BRAR, GARY EDWARD
713 VALLAD, et al. "Emerging Phytopathogen *Macrophomina Phaseolina*: Biology, Economic Importance
714 and Current Diagnostic Trends." **Critical reviews in microbiology** 38(2): 136-51, 2012.
715
- 716 KAUR, SURINDER, G S DHILLON, S K BRAR, AND V B CHAUHAN. 2012. "Carbohydrate Degrading
717 Enzyme Production by Plant Pathogenic Mycelia and Microsclerotia Isolates of *Macrophomina*
718 *Phaseolina* through Koji Fermentation." **Industrial Crops & Products** 36(1): 140-48, 2012.
719

- 720 KUPPER, K. C.; BELLOTTE, J. A. M.; GOES, A. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum*
721 agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**,
722 jaboticabal-SP, v. 31, n. 4, p. 1004-1015, 2009.
723
- 724 LAI, MW e LIOU, RF. Dois genes que codificam xilanases GH10 são essenciais para a virulência do
725 patógeno vegetal oomiceto *Phytophthora parasitica*. **Genética Atual**, 64, 931-943, 2018.
726
- 727 LANUBILE, A.; MUPPIRALA, U. K.; SEVERIN, A. J; MAROCCO, A.; MUNKVOLDET, G. P.
728 Transcriptome profiling of soybean (*Glycine max*) roots challenged with pathogenic and non-
729 pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. **BMC Genomics**.v. 16,
730 2015;<https://doi.org/10.1186/s12864-015-2318-2>.
731
- 732 LEONOV V.V., MIRONOV A.YU., ANANINA I.V., RUBALSKAYAE.E. & SENTYUROVA L.G.
733 Mikrobnye siderofory: struktura, svoystva, funkci [Siderophores of microbes: structure, properties and
734 functions]. **Astrahanskiy Meditsinskiy Zhurnal** 11(4): 24-37. 2016.
735
- 736 LI, Y., GAI, Z., WANG, C., LI, P. e LI, B. Identificação da melleína como substância patogênica de
737 *Botryosphaeria dothidea* por análise UPLC-MS/MS e bioensaio fitotóxico. **Revista de Química**
738 **Agrícola e Alimentar**, 69 (30), 8471-8481, 2021.
739
- 740 LODHA, S.; MAWAR, R. Population dynamics of *Macrophomina phaseolina* in relation to disease
741 management: A review. **Journal of Phytopathology**, 168: 1-17, 2020.
742
- 743 LUNA A. B; BURGUETE G. C; FENTANES E. G; CARREÓN L. S. **Inhibición del crecimiento de**
744 **colletotrichum gloeosporioides mediante 09 antibióticos lipopeptídicos producidos por**
745 **Bacillus sp. 83**. instituto de biotecnología, universidad nacional autónoma de méxico; cuernavaca,
746 morelos, 62210. 2015.
747
- 748 MACHADO, A. R. et al. Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of
749 *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. **European Journal of Plant**
750 **Pathology**, 153: 89-100, 2019.
751
- 752 MAHATO, SB et al. "Structure and Stereochemistry of Phaseolinic Acid: A New Acid from
753 *Macrophomina Phaseolina*." **Journal of Natural Products** 50(2): 245-47, 1987.
754
- 755 MAT RAZALI, N.; HISHAM, SN; KUMAR, IS; SHUKLA, RN; LEE, M.; ABU BAKAR, MF; NADARAJAH,
756 K. Genômica Comparativa: Insights sobre a Patogenicidade e Estilo de Vida de *Rhizoctonia solani*.
757 **Internacional J. Mol. Ciência**. 2021, 22, 2183. <https://doi.org/10.3390/ijms22042183>
758
- 759 MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de fitopatologia**. Universidade Federal Rural de Pernambuco,
760 Departamento de Agronomia -Área de Fitossanidade, Recife-PE, 2001.
761
- 762 MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M.; MENEZES, M. Importância dos
763 patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G.
764 T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife:
765 Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 1-18;74, 2005.
766
- 767 MONTEIRO, M. C. P., ALVES, N. M., QUEIROZ, M. V., DE PINHO, D. B., PEREIRA, O. L., SOUZA,
768 S. M. C., et al. Antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **Biosci**. J.v. 33, n. 2 p.
769 381-389, 2017. doi: 10.14393/BJ-v33n2-34494.
770
- 771 MOREIRA, G. J. B. et al. **Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis* in vitro**. **Biota**
772 **Amazônia** (Biote Amazonie), v. 7, n. 3, p. 45-51, 2017.
773
- 774 MURAKAMI, L. Y.; FERREIRA, R. C. B.; SOUZA, G. S.; LUCHINI, L. C. Mineralização e Sorção do
775 Fungicida Fluopicolida de Amostras de Solos Neossolo e Latossolo em áreas Preservadas e áreas
776 Tratadas. **Revista Pesticidas - Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. v. 24. P. 33-42. Curitiba, jan./dez
777 2014.
778

- 779 NAGAO, T. ADACHI K. SAKAI M. NISHIJIMA, M, H. SANO. Novas macrolactinas como lactonas
780 antibióticas de uma bactéria marinha. **Antibiótico.**, 54 (4), pp. 333 - 339. 2001.
781
- 782 NAGARAJ, B.; SUNKAD, G.; PRAMESH, D.; NAIK, M.; PATIL, M. Estudos de gama de hospedeiros
783 do fungo *Rhizoctonia solani* (Kuhn). **Internacional J. Curr. Microbiol. Aplicativo. Ciência**, 6, 3856-
784 3864, 2017.
785
- 786 ONGENA M, JACQUES P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant diseases biocontrol.
787 **Trends Microbiol** 16(3): 115-125. 2008.
788
- 789 PANDEY C., PRABHA D., NEGI Y.K., MAHESHWARI D.K., DHEEMAN S., GUPTA M. Macrolactin A
790 mediated biocontrol of *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* infestation on *Amaranthus*
791 *hypochondriacus* by *Bacillus subtilis* BS-58. **Front Microbiol**, 14, 1105849. Piggot PJ, Hilbert DW.
792 Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol*. 2004 Dec;7(6):579-586. 2023.
793
- 794 PELCHOVICH G., OMER-BENDORI S. & GOPHNA U. Menaquinone and iron are essential for
795 complex colony development in *Bacillus subtilis*. **PLoS One** 8: e79488. doi:
796 10.1371/journal.pone.0079488. 2013.
797
- 798 RABBE M.F., ALI MD.S., CHOI J., HWANG B.S., JEONG S.CH. & BAEK K.-h. *Bacillus velezensis*: A
799 Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. **Molecules** 24: 1046.
800 doi:10.3390/molecules24061046, 2019.
801
- 802 RAMOS-SANTOS, C., HOFFMAN, ZB, de MATOS-MARTINS, VP, Lopes de Oliveira, PS, RULLER,
803 R., MURAKAMI, MT. Mecanismos moleculares associados à degradação da xilana por patógenos de
804 plantas *Xanthomonas*. **Estrutura e dobramento de proteínas**, 289(46), P32186-32200, 2014.
805
- 806 RÊGO-MACHADO, C. M. et al. Cossupressão à tecnologia de RNAi: histórico, mecanismo e
807 exemplos de aplicação tópica de RNA para controle de fitopatógenos. **Embrapa Hortaliças-**
808 **Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2021.
809
- 810 SALAZAR, F., ORTIZ, A. & SANSINENEA, E. Uma forte atividade antifúngica de 7- O -Succinil
811 Macrolactina A vs Macrolactina A de *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149. **Corr Microbiol** 77,
812 34093413). <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02200-2>, 2020.
813
- 814 SALES JÚNIOR, R. et al. Pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in cowpea.
815 **Revista Caatinga**, 33: 395-401, 2020.
816
- 817 SALVATORE, MM, FÉLIX, C., LIMA, F., FERRE, V., NAVIGLIO, D., et al. Metabólitos Secundários
818 Produzidos por *Macrophomina phaseolina* Isolada de Eucalyptus globulus. **Agricultura**, 10 (3), 72,
819 2020.
820
- 821 SARKAR, TS, BISWAS, P., GHOSH, SK, & GHOSH, S. Produção de óxido nítrico pelo patógeno
822 necrotrófico *Macrophomina phaseolina* e a planta hospedeira na podridão do carvão da juta:
823 complexidade da interação entre as interações necrotróficas-planta hospedeira. **Plos Um**, 9(9), 1-17,
824 2014.
825
- 826 SAVOY, V. L. T. **Classificação dos Agrotóxicos**. Biológico. São Paulo, v. 73, n. 1, p. 91- 92. Instituto
827 Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Proteção Ambiental - Palestra. 2011.
828
- 829 SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and
830 bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n.
831 5, p. 158-164, 1996.
832
- 833 SCHNEIDER, K., CHEN, XH, VATER, J., FRANKE, P., NICHOLSON, G., BORRISS, R., ET AL. **A**
834 **macrolactina é o produto da biossíntese de policetídeos do cluster pks 2 de *Bacillus***
835 ***amyloliquefaciens*** FZB42. *J.Nat. Prod.* 70, 1417-1423. doi: 10.1021/np070070k, 2007.
836
- 837 SHORT, G. E., T.D. WYLLIE, AND V.D. AMMON. "Quantitative Enumeration of *Macrophomina*
838 *Phaseolina* in Soybean Tissues." **Phytopathology** 68(5): 736-41, 1978.

- 839
840 SILVA, Célia CG; SILVA, Sofia PM; RIBEIRO, Susana C. Application of Bacteriocins and Protective
841 Cultures in Dairy Food Preservation. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 594, 2018.
842
- 843 SINHA, N., PATRA, SK, SARKAR, TS, & GHOSH, S. A análise do secretoma identificou superóxido
844 dismutase extracelular e catalase de *Macrophomina phaseolina*. *Arquivos de Microbiologia*, 204 (1),
845 1-11, 2021.
846
- 847 SINHA, N., PATRA, SK, & GHOSH, S. A análise do secretoma de *Macrophomina phaseolina*
848 identifica uma série de supostos fatores de virulência responsáveis pela doença da podridão do
849 carvão nas plantas. **Fronteiras em Microbiologia**, 13, 623, 2022.
850
- 851 STEFANELLO, L. et al. Manejo da podridão radicular da mandioca pela combinação de manejo de
852 solo, variedade resistente e controle biológico com *Trichoderma harzianum*. **Revista Raízes e**
853 **Amidos Tropicais**, v. 13, n. 1, p. 31-45, 2017.
854
- 855 TEIXEIRA, G. M. et al. Genomic insights into the antifungal activity and plant-growth 1248 promoting
856 in *Bacillus velezensis* CMRP 4490. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1249 3495, 2020.
857
- 858 TRIGOS, ANGEL, SILVIA REYNA, BEATRIZ MATAMOROS, AND G GONZALEZ. "Macrophominol a
859 Diketopiperazine from Cultures of *Macrophomina Phaseolina*." **Pergamon** 40(6): 1697-98, 1995.
860
- 861 VAN DEN BOSCH, R., P.S. MESSENGER & A.P. GUTIERREZ. An introduction to biological control.
862 *New York, Plenum Press*, 247p, 1982.
863
- 864 VERWAAIJEN, B.; WIBBERG, D.; KROBER, M.; WINKLER, A.; ZRENNER, R.; BEDNARZ, H.;
865 NIEHAUS, K.; GROSCHE, R.; PÜHLER, A.; SCHLÜTER, A. **O transcriptoma de *Rhizoctonia solani***
866 **AG1-IB (isolado 03/07/14) durante a interação com a planta hospedeira alface (*Lactuca sativa* L.)**.
867 *PLoS ONE* 12, e0177278, 2017.
868
- 869 WRATHER, J.A.; ANDERSON, T.R.; ARSYAD, D.M.; GAI, J.; PLOPER, D.L.; PORTA-PUGLIA, A.;
870 RAM, H.H.; YORINORI, J.T. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing
871 countries in 1994. **Plant Disease**, v. 81, n. 1, p. 107-110, 1997.
872 WRATHER, J.A.; KENDIG, S.R.; TYLER, D.D. Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* population
873 density and soybean yield. **Plant Disease**, v. 82, n. 2, p. 247-250, 1998.
874
- 875 YANG, H. et al. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the purification
876 of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 9, p.
877 2529-2542, 2015.
878
- 879 ZILLI, J. E.; NECHET, K. L.; ALMEIDA, B. HALFELD-VIEIRA; VITAL, M. S. Diversidade de
880 microrganismos do solo com potencial biotecnológico. **Resumo do Workshop PanAmazônico de**
881 **Biodiversidade do Solo**. Rio Branco, Acre. 5pp, 2007.
882
- 883 ZHAN, J.; MCDONALD, B. A. Experimental measures of pathogen competition and relative fitness.
884 **Annual Review of Phytopathology**, 51: 131-153, 2013.