PAULA DE OLIVEIRA GOUVEIA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Bacillus velezensis* CMRP4490 PARA A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOFUNGICIDAS VOLTADOS AO CONTROLE DE *Macrophomina phaseolina*

Londrina
2026

PAULA DE OLIVEIRA GOUVEIA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Bacillus velezensis* CMRP4490 PARA A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOFUNGICIDAS VOLTADOS AO CONTROLE DE *Macrophomina phaseolina*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.
Orientador: Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior

Londrina
2026

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

G719p Gouveia, Paula de Oliveira .
G719p : POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE Bacillus velezensis CMRP4490 PARA A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOFUNGICIDAS VOLTADOS AO CONTROLE DE Macrophomina phaseolina / Paula de Oliveira Gouveia. - Londrina, 2026.
87 f. : il.

Orientador: Admilton Gonçalves de Oliveira Junior.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2026.
Inclui bibliografia.

1. Bacillus - Tese. 2. Downstream - Tese. 3. Fermentação - Tese. 4. Metabólitos - Tese. I. Gonçalves de Oliveira Junior, Admilton . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 574

PAULA DE OLIVEIRA GOUVEIA

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Prof. Dr. Doumit Camilios-Neto
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Dra. Maria Luiza Abreu Nicoletto
Bio3 Biotecnologia

Dra. Sandriele Aparecida Noriler
Bio3 Biotecnologia

Dr. Leonardo Cardoso Alves
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Londrina, 30 de abril de 2026

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela base e apoio incondicional. Expresso minha profunda gratidão à minha mãe, Tathiane, que priorizou minha formação acadêmica e instigou em mim o apreço pelo saber; sua trajetória e valores permanecem como minha maior inspiração.

Ao meu companheiro, Angelo, pelo incentivo constante e pelo acolhimento em todas as etapas desta jornada. Seu apoio emocional e compreensão foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Agradeço nominalmente a Fauzze, Lucas, Eduardo e Maria Luiza, cuja amizade e suporte tornaram este percurso possível, e aos integrantes do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM), pelo auxílio técnico e pela valiosa troca de conhecimentos durante a execução experimental.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Admilton G. de Oliveira Jr., pela confiança, pela oportunidade concedida e pela paciência dedicada à minha orientação. Seus ensinamentos foram primordiais para o meu amadurecimento científico.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina pelo privilegiado ensino superior de alta qualidade. Aos professores e funcionários, minha gratidão pelo trabalho árduo e contribuições essenciais para minha formação acadêmica. À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPPG) e ao Departamento de Microbiologia, meu reconhecimento pelo apoio institucional. Ao órgão de fomento CAPES por disponibilizar a ajuda monetária essencial para que fosse possível a realização deste trabalho.

RESUMO

GOUVEIA, Paula Oliveira. **Potencial biotecnológico de *Bacillus velezensis* CMRP4490 para a produção de metabólitos biofungicidas voltados ao controle de *Macrophomina phaseolina***. 2024-2026. 96. Dissertação de Mestrado em Microbiologia – Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024-2026.

O agronegócio enfrenta o desafio de mitigar os significativos impactos ambientais e o desequilíbrio ecológico decorrentes do modelo de manejo baseado no uso intensivo e exclusivo de defensivos químicos sintéticos. Diante desse cenário, o desenvolvimento de bioinsumos microbianos, como os metabólitos antifúngicos produzidos pelo gênero *Bacillus*, surge não como uma solução de substituição total, mas como um aliado estratégico no manejo integrado. Essa abordagem biotecnológica, caracterizada pela alta especificidade e rápida degradação, contribui para a redução do impacto ambiental e auxilia no controle de fungos fitopatogênicos, a exemplo de *Macrophomina phaseolina*. O objetivo deste trabalho foi produzir, fracionar e identificar os metabólitos secundários da cepa *Bacillus velezensis* CMRP4490, avaliando seu potencial biológico e otimizando os processos de isolamento. A metodologia englobou a caracterização macromorfológica bacteriana em meios solidificados e ensaios de escalonamento da fermentação líquida submersa, partindo de frascos agitados (*shaker*) para biorreator de bancada (3 L) e, posteriormente, para biorreator em escala piloto (40 L). O crescimento populacional e a atividade antagonista foram monitorados por quantificação de células viáveis, testes de poço-difusão em ágar, *Spot on lawn* e determinação do Índice de Crescimento Micelial (ICM). Para as etapas de recuperação (*downstream*), foi realizada precipitação ácida por ajuste de pH, utilizando pH 2,0 e pH 4,0, seguida por extração em fase sólida (EFS), isolamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e anotação molecular utilizando espectrometria de massas (MALDI-TOF e LC-MS). Os resultados demonstraram que a biossíntese máxima de compostos ativos é tempo-dependente e atrelada ao platô de biomassa celular, alcançando seu pico de eficácia antifúngica em 48 horas de cultivo em escala piloto. A recuperação dos metabólitos por precipitação ácida revelou-se um método eficiente, sendo o ajuste para pH 4,0 recomendado por apresentar maior consistência e reprodutibilidade analítica. O precipitado demonstrou forte atividade inibitória dose-dependente contra *M. phaseolina*, induzindo 87,7% de supressão fúngica na concentração de 500 µg/mL após 72 horas de incubação. O fracionamento cromatográfico permitiu isolar a fração bioativa F4, que inibiu 100% do crescimento fúngico nas concentrações 36,5 e 18,25 µg/mL. Complementarmente, a espectrometria de massas detectou correspondências moleculares para lipopeptídeos das famílias surfactina, iturina, corroborando a análise genômica prévia da cepa. Conclui-se que a linhagem *B. velezensis* CMRP4490 detém alto potencial biotecnológico para atuar como biofungicida e que o protocolo estabelecido representa uma via metodológica robusta e eficaz para a formulação de novos defensivos biológicos e bioquímicos, consolidando-se como uma importante ferramenta aliada à sustentabilidade no campo.

Palavras-chave: *Bacillus velezensis*; Bioinsumos; *Macrophomina phaseolina*; Lipopeptídeos; *Downstream*.

ABSTRACT

GOUVEIA, Paula Oliveira. **Biotechnological potential of *Bacillus velezensis* CMRP4490 to produce biofungicidal metabolites aimed at controlling *Macrophomina phaseolina*.** 2024-2026. 96p. Master's Thesis (Master in Microbiology) – Department of Microbiology, State University of Londrina (UEL), Londrina, 2024-2026.

Agribusiness faces the challenge of mitigating the significant environmental impacts and ecological imbalance resulting from a management model based on the intensive and exclusive use of synthetic chemical pesticides. Given this scenario, the development of microbial bioinputs, such as antifungal metabolites produced by the genus *Bacillus*, emerges not as a total substitution solution, but as a strategic ally in integrated management. This biotechnological approach, characterized by high specificity and rapid degradation, contributes to reducing environmental impact and assists in the control of phytopathogenic fungi, such as *Macrophomina phaseolina*. The objective of this work was to produce, fractionate, and identify the secondary metabolites of the *Bacillus velezensis* CMRP4490 strain, evaluating its biological potential and optimizing the isolation processes. The methodology encompassed bacterial macromorphological characterization in solidified media and scale-up assays of submerged liquid fermentation, starting from shake flasks to a bench-top bioreactor (3 L) and, subsequently, to a pilot-scale bioreactor (40 L). Population growth and antagonistic activity were monitored by quantifying viable cells, agar well diffusion tests, Spot on lawn, and determining the Mycelial Growth Index (MGI). For the recovery stages (downstream), acid precipitation was performed by pH adjustment, using pH 2.0 and pH 4.0, followed by solid-phase extraction (SPE), isolation by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), and molecular annotation using mass spectrometry (MALDI-TOF and LC-MS). The results demonstrated that the maximum biosynthesis of active compounds is time-dependent and linked to the cellular biomass plateau, reaching its peak of antifungal efficacy at 48 hours of cultivation on a pilot scale. The recovery of metabolites by acid precipitation proved to be an efficient method, with the adjustment to pH 4.0 being recommended for presenting greater consistency and analytical reproducibility. The precipitate showed strong dose-dependent inhibitory activity against M. phaseolina, causing 87.7% fungal suppression at a concentration of 50 µg/mL after 72 hours of incubation. Chromatographic fractionation allowed the bioactive fraction F4 to be isolated, which inhibited 100% of fungal growth at concentrations of 36.5 and 18.25 µg/mL.. Complementarily, mass spectrometry detected molecular matches for lipopeptides from the surfactin, iturin, and fengycin families, corroborating the previous genomic analysis of the strain. It is concluded that the *B. velezensis* CMRP4490 strain holds high biotechnological potential to act as a biofungicide and that the established protocol represents a robust and effective methodological pathway for the formulation of new biological and biochemical pesticides, consolidating itself as an important tool allied to sustainability in the field.

Keywords: *Bacillus velezensis*; Bioinputs; *Macrophomina phaseolina*; Lipopeptides; Downstream.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Custo de produção de soja entre duas importantes regiões produtoras entre 2020 e 2024 no Brasil e Estados Unidos. 16
Figura 2: Eventos presumidos e interações moleculares que determinam o resultado da infecção do hospedeiro por *M. phaseolina*. 21
Figura 3: Ciclo esquizotrófico do fungo *Sclerotinia sclerotiorum.* 23
Figura 4: Estrutura química da surfactina, e seus derivados contendo sete resíduos de aminoácidos α e um β. 25
Figura 7: Coloração de Gram e endósporos da linhagem CMRP4490. 27
Figura 8: Potencial antagônico da linhagem CMRP4490 contra fungos fitopatogênicos 29
Figura 9: Registro das unidades formadoras de colônias com 18, 24, 36 e 48 horas de incubação. 42
Figura 10: Contagem de células viáveis da fermentação em biorreator de bancada com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico. 44
Figura 11: Avaliação da atividade antifúngica contra *M. phaseolina* das amostragens durante fermentação em biorreator de bancada IKA com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico....45
Figura 12: Avaliação da atividade antifúngica contra *S. sclerotiorum* das amostragens durante a fermentação em Biorreator Piloto com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico (1ª fermentação). 46
Figura 13: Avaliação da atividade antifúngica contra *M. phaseolina* das amostragens durante fermentação em biorreator piloto com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico (2ª fermentação). 48
Figura 14: Contagem de células viáveis da 2ª fermentação em biorreator piloto com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico. 49
Figura 15: Medidas de densidade óptica da 2ª fermentação em biorreator piloto com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico. 49
Figura 16: Análise não paramétrica utilizando a medida da área dos halos de inibição no teste de poço difusão do precipitado contra *M. phaseolina*....54
Figura 20: Teste ICM com precipitado contra *M. phaseolina* após 72 horas de incubação. 58
Figura 22: Curva de crescimento fúngico durante 40 dias na presença de diferentes concentrações do precipitado no teste de inibição do crescimento micelial contra *M. phaseolina*. 58
Figura 23: Exemplo de análise do precipitado em HPLC semipreparativo e os 4 picos referentes as frações: F1, F2, F3 e F4, separados pelas linhas definidas pelo software para cada pico respectivamente....59
Figura 24: Teste de poço difusão em ágar contra *M. phaseolina* com as frações obtidas a partir do primeiro fracionamento em HPLC. 60
Figura 25: Curva de crescimento fúngico na presença de diferentes concentrações da fração F4 por precipitação ácida no teste de inibição do crescimento micelial contra *M. phaseolina*. 61
Figura 26: Teste ICM com fração F4 contra *M. phaseolina* após 72 horas de incubação. 61
Figura 27: Espectros obtidos utilizando método de aquisição de massas MALDI-TOF e indicação de compostos pela similaridade da razão massa carga. 62
Figura 28: Estrutura química do (1R,2R)-methyl dihydrojasmonate....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Doenças causados por fungos do solo sobre as principais culturas agrícolas no Brasil. 19
Tabela 2: Compostos produzidos por *M. phaseolina*. 22
Tabela 3: Clusters Gênicos Biossintéticos (BGCs) encontrados no genoma da linhagem CMRP4490 usando o servidor web antiSMASH 5.1.0. 28
Tabela 5: Características das unidades formadoras de colônias com 18 horas de incubação. 43
Tabela 6: Características das unidades formadoras de colônias com 24 horas de incubação. 43
Tabela 7: Características das unidades formadoras de colônias com 36 horas de incubação. 43
Tabela 8: Características das unidades formadoras de colônias com 48 horas de incubação. 43
Tabela 9: Resultado do ensaio microbiológico de poço difusão em ágar contra *M. phaseolina* e amostragem durante a fermentação em Biorreator de bancada IKA com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico. 45
Tabela 10: Medidas dos halos de inibição contra *S. sclerotiorum* das amostragens durante fermentação em Biorreator Piloto com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico (1ª fermentação). 47
Tabela 11: Medidas de densidade óptica da 1ª fermentação em biorreator piloto com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico. 47
Tabela 12: Medidas dos halos de inibição contra *M. phaseolina* das amostragens durante fermentação em biorreator piloto com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico (2ª fermentação). 48
Tabela 13: Medida dos halos de inibição resultante de 200ul do precipitado obtido pelo ajuste de pH do fermentado, no teste de poço difusão contra *M. phaseolina* em placas de 90 mm contendo meio BDA + 0,1% cloranfenicol. 50
Tabela 14: Medida dos halos de inibição do precipitado pelo ajuste de pH do fermentado, no teste *Spot on Lawn* contra *M. phaseolina* em placas de 90 mm contendo meio BDA + 0,1% cloranfenicol na concentração 1 mg/10 µL. 51
Tabela 15: Volume de ácido e base adicionados ao caldo fermentado para ajuste de pH. 53
Tabela 16: Cálculos estatísticos para otimização da precipitação ácida com fermentado da linhagem CMRP4490 em biorreator de bancada. 53
Tabela 17: Resultado do ensaio microbiológico poço difusão em ágar e avaliação da atividade antifúngica de 200 µL dos produtos da precipitação ácida por meio das medidas de inibição do crescimento fúngico. 54
Tabela 18: Resultado do ensaio microbiológico de poço difusão em ágar, utilizando uma concentração de amostra conhecida (20 mg/200 µL) e avaliação da atividade antifúngica contra *M. phaseolina* dos extratos de diferentes fermentações. 55
Tabela 19: Médias das inibições no ensaio *spot on lawn* contra *M. phaseolina* com concentração amostral 500 µg/10 µL 56
Tabela 20: Porcentagem de inibição do precipitado obtido por precipitação ácida no teste de inibição do crescimento micelial contra *M. phaseolina*. 57
Tabela 23: Comparação de massas observadas na literatura e massas obtidas pela análise do fermentado em *shaker* da linhagem CMRP4490, utilizando o método de aquisição de massas MALDI-TOF 62
Tabela 24: Análise espectrométrica de compostos similares à surfactina. 63
Tabela 25: Análise espectrométrica de compostos similares à iturina 64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMRP	Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense
CV	Coeficiente de Variação
EFS	Extração em Fase Sólida
GNPS	*Global Natural Products Social Molecular Networking*
LABIM	Laboratório de Biotecnologia Microbiana
LB	Luria Bertani
LLE	Extração Líquido-Líquido
NRPS	Sintase de Peptídeo Não Ribossomal
MYP	Ágar Base Seletivo *Bacillus cereus*
NRP	Peptídeo Não Ribossômico
NRPS	Sintetase de Peptídeo Não Ribossômicos
PKS	Sintase de Poliquetídeo
RPM	Rotação por minuto
SPE	*Solid Phase Extraction*
TSA	*Tryptic Soy Agar*
TSB	*Tryptic Soy Broth*
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UEM	Universidade Estadual de Maringá

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ---- *12*

2 OBJETIVOS ---- ***14***

2.1 Objetivo Geral ---- 14

2.2 Objetivos Específicos ---- 14

3 REVISÃO DA LITERATURA ---- ***15***

3.1 Uso de Insumos no Agronegócio ---- 15

3.2 Bioinsumos na Agricultura ---- 17

3.3 Fungos Fitopatogênicos ---- 18

3.3.1 *Macrophomina phaseolina* ---- 20

3.3.2 Sclerotinia sclerotiorum ---- 22

3.4 Metabólitos Antifúngicos Produzidos por *Bacillus* ---- 23

3.5 Caracterização de *Bacillus velezensis* ---- 26

3.6 Estado da Arte em Produção de Biomoléculas ---- 29

3.6.1 Convergência de Evidências ao Escopo da Atual Pesquisa ---- 31

4 MATERIAL E MÉTODOS ---- ***32***

4.1 Microrganismos ---- 32

4.2 Confecção do Banco de Células ---- 32

4.3 Caracterização Macromorfológica ---- 33

4.3.1 Fermentação líquida submersa em agitador orbital ---- 33

4.3.2 Técnica de Cultivo e Registro de Mídias ---- 33

4.4 Produção e Cinética de Crescimento (*Upstream*) ---- 34

4.4.1 Fermentação em biorreator de bancada (5 L) ---- 34

4.4.2 Fermentação em biorreator piloto (100 L) ---- 35

4.1 Processamento e Purificação (*Downstream*) ---- 35

4.1.1 Precipitação Por Ajuste de pH ---- 35

4.1.1.1 Otimização da precipitação ---- 35

4.1.2 Extração em Fase Sólida (EFS ou SPE) ---- 36

4.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ---- 36

4.1.3.1 Análise analítica por CLAE ---- 36

4.1.3.2 Análise preparativa por CLAE ---- 37

4.1.4 Espectrometria de Massas ---- 37

4.1.4.1 Espectrometria por MALDI-TOF/MS ---- 37

4.1.4.2 Espectrometria por LC-MS ---- 37

4.1.5 Estatísticas ---- 38

4.2 Ensaios Microbiológicos ---- 39

4.2.1 Quantificação de Células Viáveis e Endósporos ---- 39

4.2.2 Teste de Poço-difusão em Ágar ---- 39

4.2.3 Teste de Difusão em Ágar: *Spot on lawn* ---- 40

4.2.4 Índice de Crescimento Micelial (ICM) ---- 41

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO ---- ***42***

5.1 Caracterização Macromorfológica ---- 42

5.2 Produção e Cinética de Crescimento (*Upstream*) ---- 44

5.2.1 Cinética de Crescimento e Produção de Metabólitos em Biorreator de Bancada ---- 44

5.2.2 Cinética de Crescimento e Produção de Metabólitos em Biorreator Piloto ---- 46

5.3 Precipitação Por Ajuste de pH ---------- 50
5.3.1 Otimização da Precipitação Ácida com Fermentado em *Shaker* ---------- 50
5.3.2 Otimização da Precipitação Ácida com Fermentado em Biorreator de Bancada. -------- 52
5.3.3 Comparação de atividade entre fermentados pós extrações ---------- 54
5.3.4 Índice de Crescimento Micelial (ICM) do Precipitado ---------- 57

5.4 Isolamento dos Metabólitos por CLAE ---------- 59
5.4.1 Índice de Crescimento Micelial (ICM) da fração F4 ---------- 60

5.5 Anotação dos Metabólitos ---------- 62
5.5.1 Caracterização de Lipopetídeos por MALDI-TOF ---------- 62
5.5.1 Identificação de metabólitos ---------- 63

6 CONCLUSÃO ---------- 65

7 APÊNDICES ---------- 78

1 INTRODUÇÃO

A preocupação crescente com as questões ambientais tem sido um dos principais motivos por trás da busca por abordagens mais sustentáveis em diversos setores da sociedade. Um campo fundamental que demanda por mudanças é a agricultura, uma atividade intrinsecamente ligada à subsistência da humanidade. A agricultura convencional mantém a produção de alimentos ao longo de décadas, contudo, é cada vez mais evidente, os impactos significativos nos ecossistemas terrestres e aquáticos. Nesse contexto, cresce a urgência por métodos produtivos que garantam o rendimento reduzindo o impacto ambiental.

Além das questões ambientais, a estimativa de crescimento populacional traz à tona outro grande desafio, deixando de estar apenas no setor econômico e passando a configurar como uma infraestrutura crítica de sobrevivência. Segundo relatório oficial da ONU intitulado "*World Population Prospects 2024*", a população mundial atingirá um pico de aproximadamente 10,3 bilhões de pessoas em 2080 (ONU, 2024), com menos recursos naturais disponíveis e sob maior pressão climática. Para suprir a crescente demanda por alimentos, o sistema de produção alimentícia global deverá passar por mudanças para garantir a segurança alimentar e nutrição de qualidade a todos (FAO, 2017).

Os fertilizantes e defensivos químicos sintéticos são amplamente utilizados para o aumento da produtividade das lavouras. No entanto, apesar dos benefícios, a presença destes compostos no solo, na água e na atmosfera trazem alterações em suas composições que comprometem o equilíbrio ecológico previamente existente (TOSI et al., 2018). Além disso, a utilização recorrente e demasiada de agroquímicos favorece o surgimento e disseminação de cepas resistentes (DEISING et al., 2008), o que ao longo do tempo, diminui sua eficácia em proteger as lavouras (KIM; KABIR; JAHAN, 2017; RANI et al., 2021). Diante dessas complexas interações entre a agricultura convencional e o meio ambiente, é imprescindível que haja desenvolvimento de técnicas e produtos que agreguem as práticas agrícolas mais sustentáveis (BABBAL; ADIVITIYA; KHASA, 2017).

O gênero *Bacillus* tem sido reconhecido como principal componente dos bioinsumos microbianos registrados pelo MAPA (2021) na agricultura brasileira. Entre os gêneros bacterianos, ele se destaca pela sustentabilidade, ampla aplicabilidade e durabilidade, decorrentes de sua capacidade de diferenciarem em endósporos

resistentes e de produzir biomoléculas altamente específicas.

Os bioestimuladores de origem microbiana são produtos utilizados na agricultura moderna com capacidade de promover o crescimento vegetal de forma sustentável e eficiente. Os produtos formulados com bactérias do gênero *Bacillus* apresentam interação benéfica com a planta através da produção de moléculas análogas a fitormônios de crescimento, além de aumentar o aproveitamento de nutrientes do solo através da solubilização de minerais no solo interação, além da indução de resistência sistêmica contra patógenos e estresses abióticos (Barbosa *et al*., 2022).

Segundo Gharsallah *et al*., (2025), cepas do g*ênero Bacillus* isoladas de raízes e solo, produziram lipopeptídeos com atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani*, apresentando inibição de 60% do micélio, apresentando melhor controle do que em ensaio de antagonismo em cultura pareada.

Um estudo sobre a diversidade química dos metabólitos produzidos *por Bacillus velezensis*, ressaltam seu potencial como biofungicidas de alta eficácia e baixo risco ambiental, bem como a necessidade de otimizar a produção, extração e formulação para aplicação prática (Salazar *et al*., 2022). Os lipopeptídeos são moléculas sintetizados pela 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.

A integração da produção de metabólitos secundários antifúngicos com a promoção de crescimento vegetal como um modelo robusto para o desenvolvimento de tecnologias agrícolas, que mantêm a produtividade ao mesmo tempo que minimizam danos ao meio-ambiente (Khan et al., 2022; Poveda & González-Andrés, 2021).

Dessa forma, o desenvolvimento de formulações baseadas em metabólitos de *B. velezensis* apresenta-se como uma resposta estratégica às necessidades da agricultura. No entanto, a transição da eficácia laboratorial para o sucesso em larga escala exige a validação dessa tecnologia. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo identificar os compostos produzidos por *B. velezensis* após fermentação líquida submersa e avaliar a performance antifúngica destas moléculas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir, fracionar e identificar metabólitos secundários produzidos pela linhagem *Bacillus velezensis* CMRP4490 e investigar a natureza química e potencial biológico dessas moléculas

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Caracterização macromorfológica das colônias;
b) Fermentação líquida submersa para produção de matabólitos de interesse;
c) Avaliação da atividade antifúngica dos metabólitos secundários;
d) Extração os metabólitos secundários;
e) Fracionamento e identificação das moléculas;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 USO DE INSUMOS NO AGRONEGÓCIO

A agricultura no Brasil é uma atividade econômica estratégica em ascensão mundial na produção de insumos e comodities como, açúcar, laranja, café, soja, milho e algodão (FAOSTAT, 2019). Em 2023, o agronegócio correspondeu a 23,8% do PIB do país, sendo que a soja e derivados lideram o mercado, atingindo cerca de 40,4% das exportações nacionais, contribuindo ativamente para o faturamento de US$166 bilhões anualmente. (CEPEA/ USP/ CNA 2023). Em relação à demanda internacional, as exportações para a China representaram, em média, 71% do total de soja entre 2020 e 2024 (COLUSSI *et al*., 2024).

O crescimento da agricultura brasileira nas últimas décadas deve-se principalmente ao consumo de químicos sintéticos amplamente utilizados para o manejo de fitopatógenos. Em 2021 o Brasil consumiu 720.870 toneladas de defensivos químicos sintéticos, aos quais o uso intensivo impacta negativamente a saúde humana e o meio ambiente, acelerando a seleção de populações resistentes e provocando falhas no controle, um ciclo que afeta a produtividade e aumenta os custos (GARUD *et al*, 2024; MURAKAMI *et al*., SAVOY, 2011; 2014).

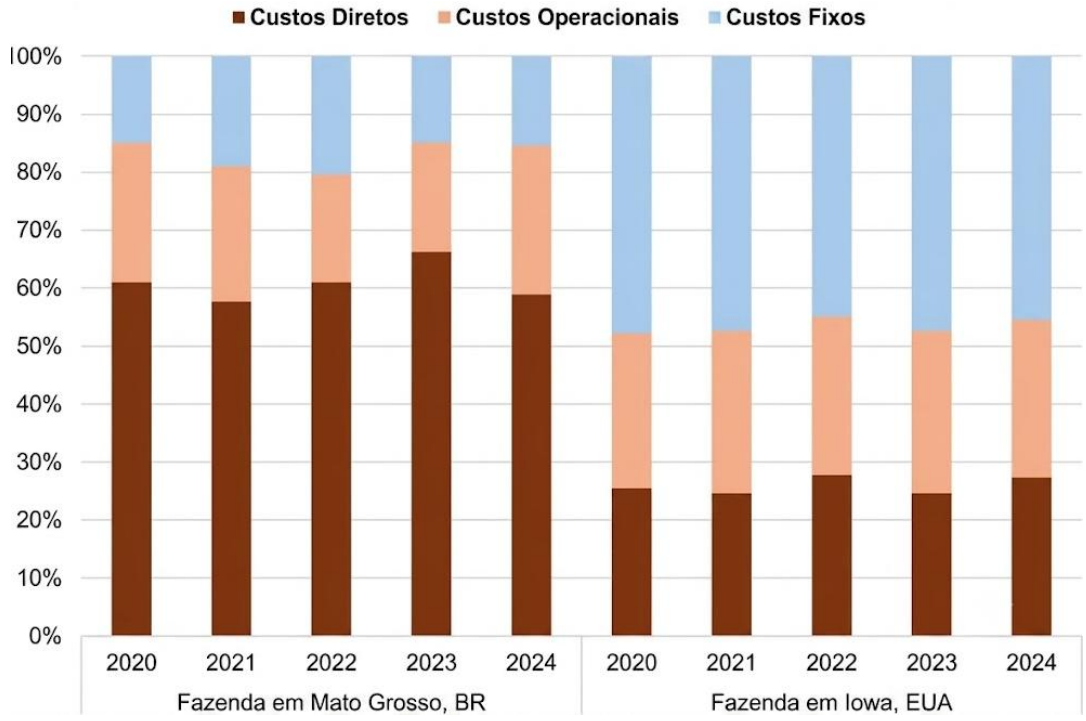
Dentre as problemáticas associadas à produção agrícola, o crescimento populacional tornou-se um importante tema. Estima-se que a população global deverá atingir cerca de 9,7 bilhões de pessoas até 2050, segundo dados do Departamento de Assuntos Sociais e Econômicos da ONU (2022). Para suprir a crescente demanda por alimentos e diminuir as perdas decorrentes de estresse bióticos e abióticos, o sistema de produção inseriu novas práticas de Manejo Integrado de Pragas e Doenças (IPDM), que consideram a combinação de métodos biológicos, culturais e químicos de forma otimizada, com o objetivo de diminuir os impactos ambientais e manter o equilíbrio econômico (GASQUES *et al*., 2012; FAO, 2017; MOREIRA *et al*., 2017).

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

Colussi e Langemeier (2026) desenvolveram pesquisas a respeito da produção de soja destacando as diferenças em implementação tecnológica, preços de insumos, fertilidade do solo, e outros fatores entre duas importantes regiões produtoras de soja no Brasil e Estados Unidos.

A partir desta análise, foi realizado um levantamento de custos de insumos categorizados em três grupos principais: custos diretos, custos operacionais e custos indiretos que podem ser observados na figura 1.

Figura 1: Custo de produção de soja entre duas importantes regiões produtoras entre 2020 e 2024 no Brasil e Estados Unidos.



Fonte: COLUSSI; LANGEMEIER, 2026 gerado pelo Agri Benchmark Network database.

Nota: Os custos diretos incluem sementes, defensivos agrícolas, fertilizantes, irrigação, seguro agrícola, secagem e financeiros. Os custos operacionais compreendem maquinário, mão de obra (tanto contratada quanto familiar), terceirização, combustível e outras despesas com energia. Os custos indiretos consistem em depreciação de terrenos, depreciação de edificações, reparos e juros, impostos sobre a propriedade, seguros e despesas diversas.

No Brasil, os custos voltados para insumos, como fertilizantes e defensivos agrícolas, ultrapassaram 60% do valor total gasto em média, durante o período de 2020 e 2024. Esses dados estão atrelados à região do Cerrado brasileiro, onde concentra-se grande parte da produção de soja e faz-se necessário o controle químico de pragas e uso de fertilizantes para correção de deficiências do solo. De modo geral, os custos totais de produção foram menores no Brasil, mesmo com os aumentos substanciais no preço dos fertilizantes registrados a partir de 2022, gerados

principalmente devido ao conflito entre Rússia e Ucrânia, países que exportavam cerca de 85% dos fertilizantes utilizados no Brasil (COLUSSI; LANGEMEIER, 2026).

Nas últimas décadas, a pesquisa para desenvolvimento de novos defensivos agrícolas evoluiu, lançando novas moléculas químicas mais seletivas, eficientes e seguras. Essa tendencia é elucidada por Lazarevic-Pašti *et al.* (2025), que destaca o decaimento do impacto ambiental e à saúde humana dos defensivos nas últimas duas décadas.

O desenvolvimento de uma nova molécula química que possa ser aplicada à agricultura é um processo demorado e complexo, como é mostrado no levantamento da CropLife International (2024), indicando que o custo médio para levar uma molécula do laboratório até o mercado pode chegar a US$ 301 milhões, somando as etapas de pesquisa, desenvolvimento e registro. Em síntese, garantir a longevidade dessas moléculas e conter a ressurgência de pragas exige doses precisas, momentos corretos de aplicação e alternância de princípios ativos.

3.2 Bioinsumos na Agricultura

O crescimento dos bioinsumos consolida o modelo agrícola sustentável por meio da inovação biotecnológica. Essas soluções atuam via biomoléculas de alta especificidade e baixa persistência ambiental, aplicáveis de forma isolada ou combinada. (CORDEAU *et al*., 2016; SUTTON *et al*., 2016; RÊGO-MACHADO *et al*., 2021).

O uso de biodefensivos tem crescido no Brasil, segundo o ministério da Agricultura e Pecuária, em 2025, foram aprovados 912 registros de produtos destinados ao controle fitossanitário de pragas e doenças, vegetais e animais, movimentando R$ 4,35 bilhões, de acordo com o estudo *FarmTrak* Bioinsumos 2024/25, da Kynetec.

Os biofungicidas microbianos utilizam microrganismos viáveis com atividade fungicida no controle fitossanitário (ABBEY et al., 2019). O biocontrole de fitopatógenos fundamenta-se em quatro modos de ação principais: competição ecológico-nutricional, antibiose via síntese de compostos antagônicos, parasitismo direto e indução de respostas de defesa endógenas no hospedeiro vegetal (CAL *et al*., 2012).

Os biofungicidas microbianos compõem o principal grupo de bioinsumos

presentes nos produtos comerciais de controle, desenvolvidos com diferentes microrganismos, incluindo *Bacillus* spp., no entanto, os compostos com atividade fungicida naturais produzidos por microrganismos são escassos no mercado (ABBEY *et al*., 2019). Esses bioprodutos apresentam vantagens que os tornam a opção ideal para o combate a pragas em culturas agrícolas, com alta seletividade, eles atuam primordialmente, somente contra o patógeno alvo. A eficiência dos mesmos pode ocorrer por contato ou por ingestão, fazendo com que as pragas parem de se alimentar levando a morte em algumas horas ou dias (KHAKIMOV *et al*., 2020).

Apesar das vantagens sob o uso de produtos naturais, a maioria se degrada facilmente no ambiente sob mudanças de temperatura, radiação ou quando expostos a enzimas de insetos após ingestão, implicando na diminuição do período de persistência no ambiente e redução de riscos para organismos não-alvo (PERTOT *et al*., 2016), sinalizando um possível objeto de estudo e otimização.

3.3 Fungos Fitopatogênicos

Os fungos representam o maior grupo de organismos fitopatogênicos, acometem diversos tipos de sistemas agrícolas e causam doenças que podem afetar todos os estágios de desenvolvimento das plantas (MICHEREFF *et al*., 2005; CORREIA; MICHEREFF, 2018). O ambiente como um todo, bem como as características do solo e da rizosfera determinam quais microrganismos estarão presentes, afetando diretamente a possibilidade de patógenos causarem ou não doenças (CHIARAMONTE; MENDES; MENDES, 2020).

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

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

Dentre as principais culturas agrícolas é possível classificar os fungos

fitopatógenos que mais as acometem. Os principais gêneros de fitopatógenos desencadeadoras de infecções são *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Sclerotinia* sp. e *Macrophomina* sp. (Tabela 1).

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

Cultura	Microrganismo patógeno	Referência
Soja	• *Rhizoctonia solani* • *Pythium* spp. • *Fusarium oxysporum f.*sp. *glycines* • *Sclerotium rolfsii* • *Macrophomina phaseolina* • *Sclerotinia sclerotiorum* • *Fusarium solani f.* sp. *sojae* • *Diaporthe phaseolorum f.* sp. *meridionalis*	LANUBILE *et al*., (2015). MICHEREFF *et al*, (2005).
Milho	• *Macrophomina phaseolina* • *Pythium* spp. • *Rhizoctonia solani*	COSTA *et al*, (2019). MICHEREFF *et al*, (2005).
Cana de açúcar	• *Thielaviopsis paradoxa* • *Pythium* spp. • *Sclerotium rolfsii*	BORGES *et al*., (2019). MICHEREFF *et al*, (2005).
Café	• *Rosellinia* spp. • *Fusarium solani* • *Rhizoctonia solani*	MICHEREFF *et al*, (2005). MONTEIRO *et al*., (2017).
Feijão	• *Fusarium oxysporum f.* sp. *phaseoli* • *Fusarium solani f* sp. *phaseoli* • *Macrophomina phaseolina* • *Sclerotinia sclerotiorum* • *Sclerotium rolfer* • *Rhizoctonia solani* • *Pythium* spp.	HENRIQUE *et al*., (2015). MICHEREFF *et al*., (2005).
Trigo	• *Polymyxa graminis*	DALBOSCO *et al*., (2002)
Arroz	• *Sclerotium rolfsii* • *Rhizoctonia solani* • *Pythium* spp.	AMAIZ *et al*., (2017). MICHEREFF *et al*., (2005).
Algodão	• *Rhizoctonia solani* • *Pythium* spp. • *Thielaviopsis basicola* • *Fusarium oxysporum f.* sp. *vasinfecton* • *Verticillium dahliae* • *Verticillium albo-altrum* • *Macrophomina phaseolina*	HALPERN *et al*., (2013). MICHEREFF *et al*. (2005).

Mandioca	• *Fusarium solani* • *Platophthora drechsleri;* • *Sclerotium rolfsii* • *Rosellinia necatrix*	MICHEREFF *et al*., 2005 STEFANELLO *et al*., 2017
Laranja	• *Phytophthora* spp. • *Fusarium solani*	MITCHEREFF *et al*. 2005 SÁENZ PEREZ *et al*. 2019

Fonte: O autor, 2026.

3.3.1 *Macrophomina phaseolina*

O fungo *Macrophomina phaseolina* foi descrito por Tassi em 1901, é pertencente à divisão *Ascomycota*, classe *Dothideomycetes* e família *Botryosphaeriaceae,* esse fitopatógeno é classificado como hemibiotrófico, por apresentar uma fase biotrófica assintomática de até 36 horas antes do início do colapso necrótico do tecido vegetal (CHOWDHURY *et al*., 2017), caracterizado por manchas pretas no tecido da planta hospedeira.

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

No Brasil, esse fitopatógeno foi detectado pela primeira vez em raízes de feijão e sucessivamente passou a infectar outros cultivares, causando doenças conhecidas como: podridão do carvão, podridão cinzenta do caule, podridão das raízes, tombamento e danos às sementes (KAUR *et al*., 2013; KHAN *et al*, 2017; WRATHER *et al*., 1997).

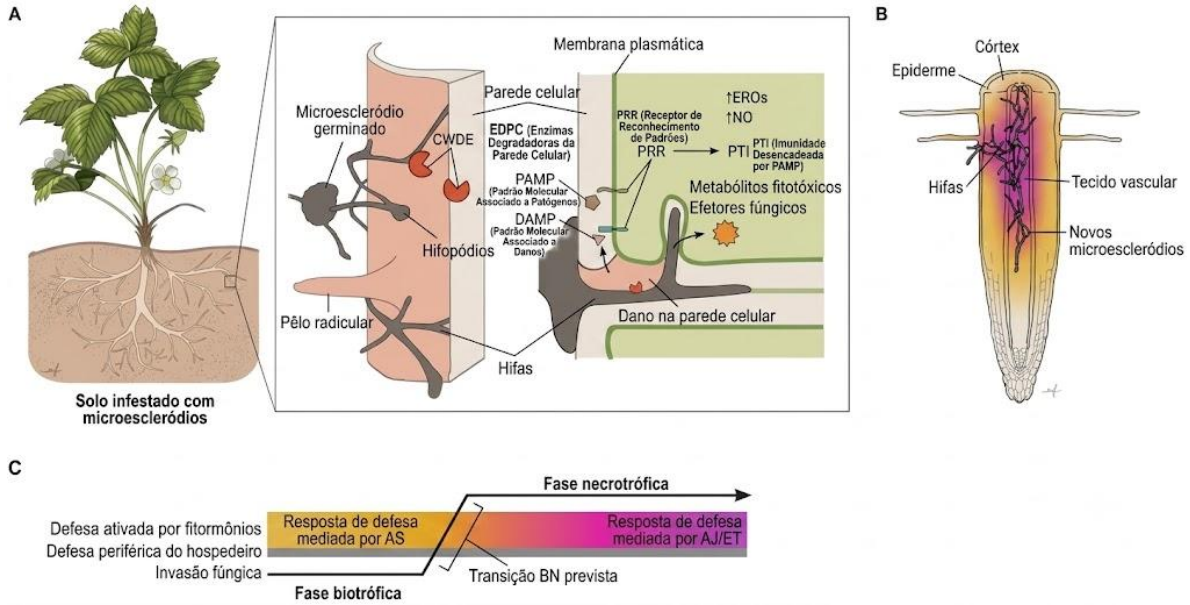
A alta variabilidade morfológica, fisiológica, patogênica e genética tornam *M. phaseolina* um fungo cosmopolita e promotor de perdas substanciais de rendimento, afetando em torno de 800 espécies de plantas de valor comercial, como: soja, melão, melancia, feijão, sorgo e algodão (LODHA; ROSA, 2020; LONGE; ROSMAN, 2022; VENDAS JÚNIOR *et al*., 2020;). Os sintomas da infecção são mais severos sob estresse térmico e hídrico, característicos de clima tropical, árido e semiáridos (Kaur *et al*., 2012).

A capacidade de sobreviver durante longos períodos em reservatórios biológicos como resíduos culturais e sementes, ocorre através de estruturas de sobrevivência composta por múltiplas hifas, conhecidas como microescleródios,

esses, promovem resistência à degradação física, química e biológica (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Quando em estado patogênico, o fungo *M. phaseolina* coloniza o tecido vascular, adentra o córtex e penetra nos vasos do xilema, podendo migrar em direção à raiz, onde obstrui mecanicamente os vasos, causando desidratação e desnutrição da planta, levando ao processo de murcha até morte (Figura 2) (KAUR, DHILLON, BRAR, VALLAD, *et al*. 2012; MAYEK-PÉREZ *et al*. 2002).

Figura 2: Eventos presumidos e interações moleculares que determinam o resultado da infecção do hospedeiro por *M. phaseolina*.



Fonte: Adaptado de Cascant-López *et al*. (2021).

Nota: Esquema do ciclo de infecção hemibiotrófica de *Verticillium dahliae* em raízes de morangueiro e vias de defesa do hospedeiro. **(A)** Germinação dos microescleródios no solo, penetração tecidual via hifopódios e secreção de enzimas degradadoras de parede celular (CWDE), acompanhada do reconhecimento imune (PAMP/DAMP) e produção de ROS/NO. **(B)** Colonização sistêmica dos tecidos vasculares e formação de novos microescleródios.

Além da produção de proteínas que desempenham papel fundamental no processo de infecção, alguns metabólitos com atividade fito tóxica já foram identificados e contribuem no processo infeccioso (BANDARA *et al*., 2018, KHAN *et al*., 2017, SINHA *et al*., 2021) (Tabela 2).

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

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

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

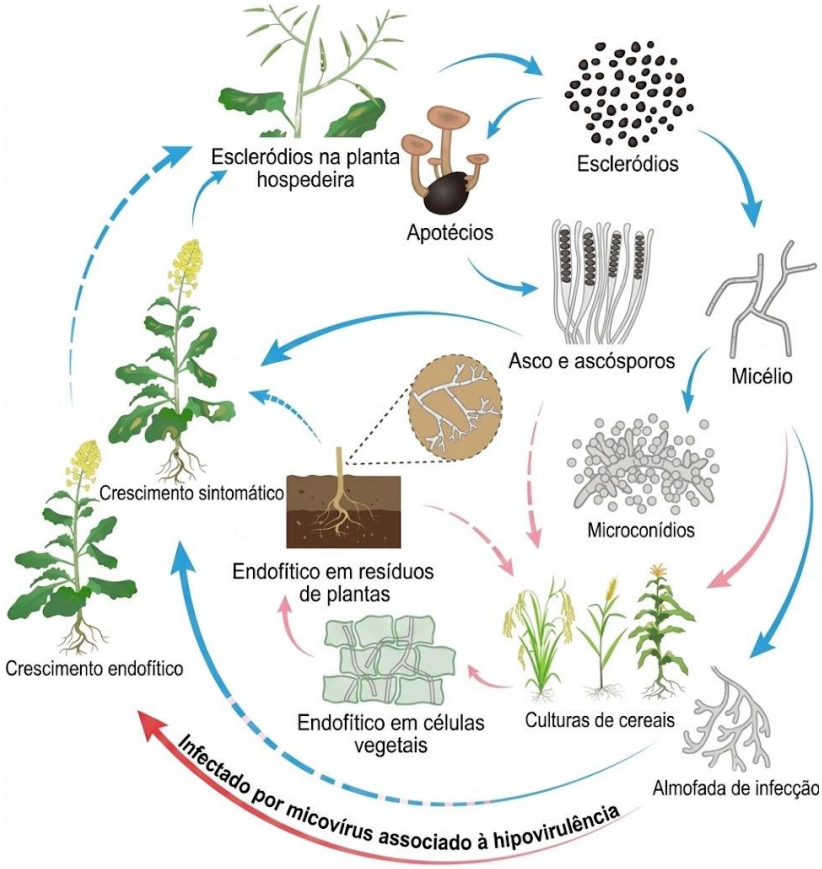
3.3.2 Sclerotinia sclerotiorum

Sclerotinia sclerotiorum é um fungo pertencente à família *Sclerotiniaceae*, da classe Leotiomycetes. É classificado como fitopatogênico hemibiotrófico capaz de infectar mais de 700 espécies de plantas causando danos significativos em diversas culturas (BOLAND; HALL, 1994; KABBAGE *et al*., 2015). Nos Estados Unidos, as perdas econômicas causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* nas culturas de soja entre 1996 e 2016 totalizaram US$ 4,663 bilhões (BANDARA et al., 2020).

A doença é conhecida popularmente como mofo branco ou podridão algodonosa, nomes que fazem referência ao micélio cotonoso que se desenvolve nas superfícies aéreas dos tecidos vegetais infectados (PURDY, 1979).

S. sclerotiorum pode apresentar-se na forma de hifas, escleródios, ascósporos ou microconídios quando *in vivo* (AMSELEM *et al*., 2011). A formação de escleródios permite a sobreviva no solo durante longos períodos podendo germinar quando em condições adequadas, produzindo hifas ou apotécios (ERENTAL *et al*., 2008; SOUSA MELO *et al*., 2019) (Figura 3).

Figura 3: Ciclo esquizotrófico do fungo *Sclerotinia sclerotiorum.*



Fonte: Adaptado de SHANG *et al*., 2024
Legenda: Formação de escleródios que podem germinar micelogenicamente, produzindo hifas, ou carpogenicamente, formando apotécios que liberam ascósporos e podem se disseminar por longas distâncias, constituindo a principal fonte de inóculo. Os ascósporos também podem atuar como inóculo quando crescem endofiticamente em plantas não hospedeiras.

A virulência de *S. sclerotiorum* é sustentada pela secreção de enzimas degradadoras da parede celular, como pectinases, celulases e proteases que desestruturam as barreiras físicas do hospedeiro, viabilizando a penetração e a colonização rápida dos tecidos vegetais (AMSELEM et al., 2011; DERBYSHIRE et al., 2017; LYU et al., 2016; XIAO et al., 2014).

3.4 Metabólitos Antifúngicos Produzidos por *Bacillus*

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).

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

Os microrganismos do gênero *Bacillus* são capazes de produzir metabólitos secundários pela via NPSP- *Nonribosomal Peptide Syntasis Pathway* ou pela via do PKS – *Polyketide Synthase* (WONG *et al*., 2008; WONG & NG, 2009; BENITEZ *et al*. 2012). Análise genômica de espécie demonstrou a presença de genes que codificam metabólitos secundários bem conhecidos, como: surfactina, fengicina, plipastatina (mais frequentes e prevalentes) bacilaeno, bacilibactina, bacilicina, subtilomicina, sublancina , butirosina, liquenicina, liquenicidina e outros agrupamentos de genes desconhecidos (OLIVEIRA *et al*., 2024).

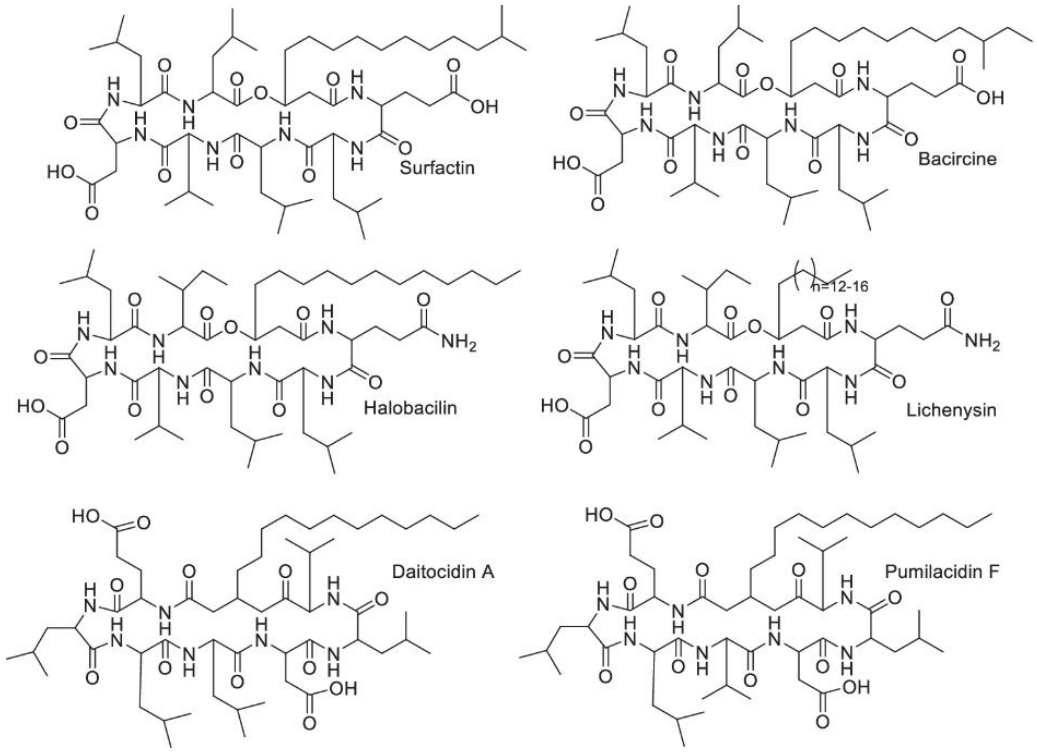
Os lipopeptídeos são peptídeos cíclicos hidrofílicos, constituídos por sete a dez α-aminoácidos ligados a um único ácido. O agrupamento ácido graxo β-amino diferencia a família das iturinas e o agrupamento β-hidroxi caracteriza a família das sufactinas. Essas moléculas têm característica anfótera, ou seja, domínios hidrofóbicos e hidrofílicos que lhes permitem estar em meios polares ou apolares (ONGENA, *et al*., 2007).

A família das iturinas apresenta uma estrutura química de pentapeptídio ou heptapeptídio cíclico com uma cadeia de ácido graxo contendo de 14 a 17 átomos de carbono. Destacam-se as iturinas A, C, D e E, bacilomicina D, F, L, bacilopeptina e mycosubtilina (MAGET-DANA & PTAK 1990; ALVAREZ, 2011; JEMI *et al*., 2017). O mecanismo de ação dessas moléculas ocorre através da membrana citoplasmática da célula-alvo, desorganiza a bicamada lipídica e ativa as fosfolipases. Dentro da membrana, elas formam estruturas oligômericas (agregados de lipopeptídeos ou agregados do complexo lipopeptídeo-fosfolípido) que formam poros e aumentam com o passar do tempo e permitem o vazamento de K+ intracelular (MAGET-DANA & PTAK, 1990).

A família das surfactinas, compõe moléculas formadas por um heptapeptídeo ligado a uma cadeia de ácido graxo contendo entre 13 e 16 átomos de carbono, que promovem a alteração na membrana fosfolipídica devido ao estabelecimento de interações fortes com a membrana (Figura 4). Surfactinas são poderosos surfactantes

com a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m em uma concentração tão baixa quanto 0,005% (SHALIGRAM; SINGHAL, 2010). Há estudos que mostram outros espectros de potencial atividade, como: antiviral, antitumoral, anticoagulante e de inibição enzimática (YAN *et al*., 2012; MNIF & GHRIBI, 2015).

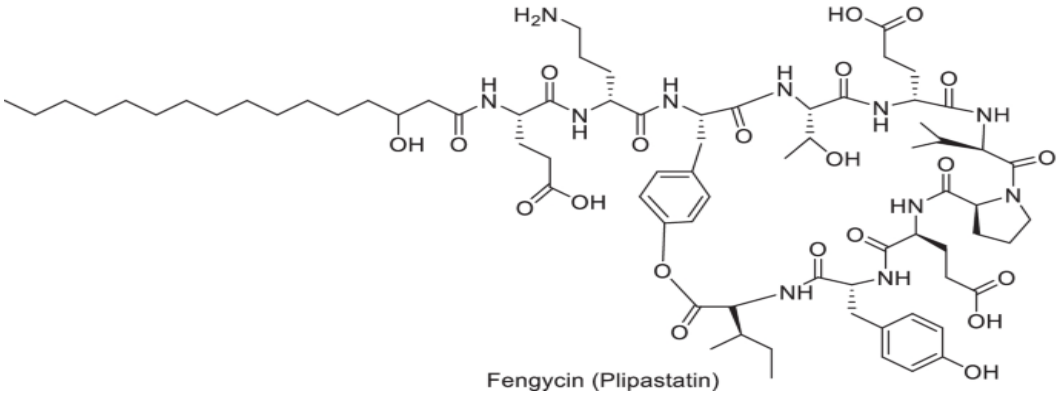
Figura 4: Estrutura química da surfactina, e seus derivados contendo sete resíduos de aminoácidos α e um β.



Fonte: OLIVEIRA *et al*., 2024.

A família das fengicinas é composta por lipodecapeptídios cíclicos ligados a uma cadeia de ácido graxo contendo entre 14 e 18 átomos de carbono (saturados ou insaturados), apresentando uma forte ação contra fungos filamentosos. As fengicinas diferem das iturinas e surfactinas pela presença de aminoácidos incomuns, como ornitina e alo-treonina. A variação da posição 6 no anel peptídico em Ala - Val permite diferenciar as estruturas das moléculas pertencentes à família da fengicina em fengicina A e B e plipastatina A e B (ONGENA *et al*., 2005; ALVAREZ, 2011; MNIF & GHRIBI, 2015) (Figura 5).

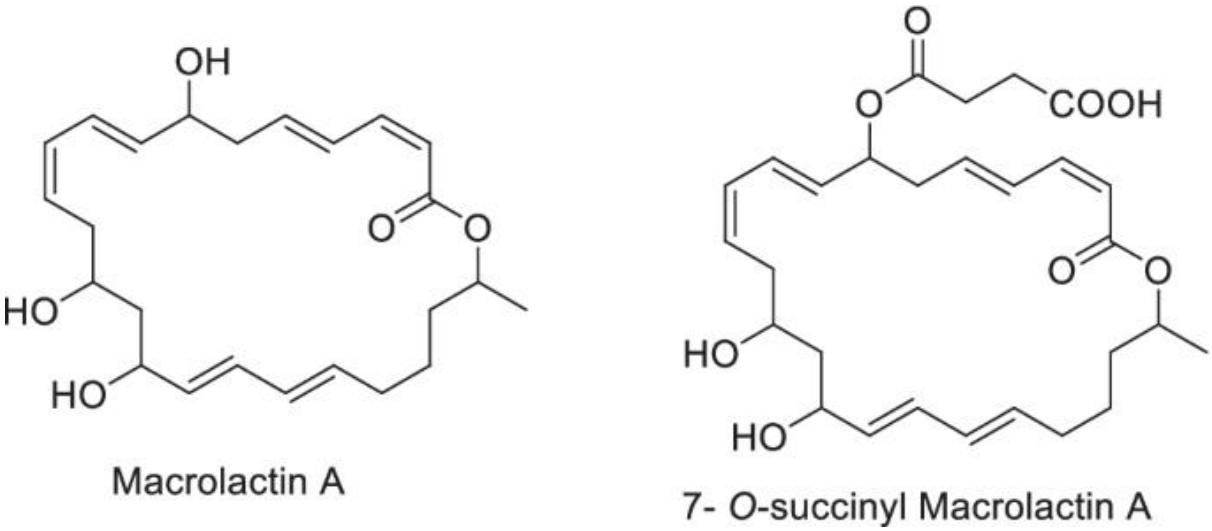
Figura 5: Estrutura química da fengicina.



Fonte: OLIVEIRA *et al*., 2024.

As macrolactinas compõem o grupo de compostos macrolídeos e podem apresentar mais de vinte derivados já descritos, essas moléculas contêm três dienos separados em um anel lactônico de 24 membros e foram isoladas de várias cepas de *Bacillus* sp. (ORTIZ, 2020). As macrolactinas são consideradas primordialmente como compostos antibióticos, contra bactérias clinicamente importantes, e patógenos bacterianos gram-positivos, e atualmente a macrolactina A e a 7-O-succinil macrolactina são associadas a atividade contra fungos fitopatogênicos (SALAZAR; ORTIZ; SANSINENEA, 2020) (Figura 6).

Figura 6: Estrutura química da macrolactina A e 7-O-succinil macrolactina A.



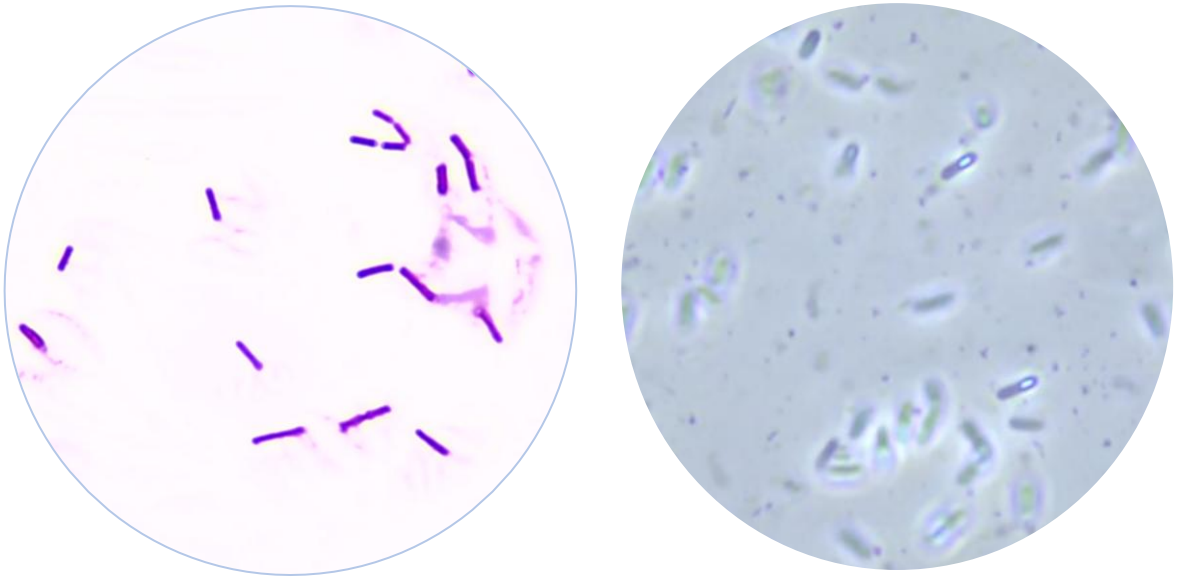
Fonte: OLIVEIRA *et al*., 2024.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DE *BACILLUS VELEZENSIS*

Bactérias do gênero *Bacillus* são pertencentes à família *Bacillaceae*, apresentam formato de bastonetes, Gram-positivos, facultativos aeróbios, catalase positivos e produtores de endósporos (MADIGAN *et al*., 2010) (Figura 7).

A vasta utilização deste gênero bacteriano na produção de fungicidas se deve ao aparato genético e grande estabilidade. Essas características estão intimamente relacionadas à capacidade de formação de endósporos, produção de metabólitos e promoção de crescimento em plantas, o que torna o gênero *Bacillus* uma escolha promissora para o desenvolvimento de produtos agrícolas mais sustentáveis (YOO *et al*., 2006; RÜCKERT *et al*., 2011; JI *et al*., 2013; BLEICH *et al*., 2015; ZHANG *et al*., 2015).

Figura 5: Coloração de Gram e endósporos da linhagem CMRP4490.



Fonte: O autor, 2026.

Legenda: Microscopia da coloração de Gram e microscopia de endósporos destacados com cor azul brilhante.

Essa espécie, *B. velezensis,* foi isolada pela primeira vez na foz do rio Vélez em Málaga (sul da Espanha) e descrita por Ruiz-García et al. 2005, como uma bactéria Gram positiva que se desenvolve na faixa de temperatura de 15 a 45 °C e faixa de pH de 5,0 a 10,0 (MAPA, 2024).

A cepa de *B. velezensis* CMRP4490, utilizada na atual pesquisa, após sequenciada apresentou um genoma estimado em 3.996.396 pares de bases e 13 clusters relacionados à síntese de moléculas com atividade antifúngica (Tabela 3), dentre eles, 8 apresentaram agrupamentos de genes biossintéticos já descritos ligados à síntese de: surfactina, butirosina A/B, macrolactina H, bacileno, fengicina, difficidina, bacilibactina e bacilisina (TEIXEIRA *et al*., 2020). Estes agrupamentos auxiliam na sobrevivência do microrganismo em ambientes hostis e na interação com a microbiota do solo, com o hospedeiro ou influenciando a diferenciação celular do

próprio organismo e do hospedeiro.

Tabela 3: Clusters Gênicos Biossintéticos (BGCs) encontrados no genoma da linhagem CMRP4490 usando o servidor web antiSMASH 5.1.0.

Cluster	Tipo	Cluster relacionado		Similaridade
1	NRPS	Surfactin	NRP: lipopeptide	82%
2	Phosphonate			
3	PKS-like	Butirosin A/butirosin B	Saccharide	7%
4	Terpene			
5	TransAT-PKS	Macrolactin H	Polyketide	100%
6	TransAT-PKS, T3PKS, TransAT-PKS-like, NRPS	Bacillaene	Polyketide + NRP	100%
7	NRPS, transAT-PKS, beta-lactone	Fengycin	NRP	100%
8	terpene			
9	T3PKS			
10	TransAT-PKS-like, transAT-PKS	Difficidin	Polyketide + NRP	100%
11	NRPS, bacteriocin	Bacillibactin	NRP	100%
12	NRPS			
13	other	Bacilysin	Other	100%

Nota: NRPS, sintase de peptídeo não ribossomal; NRP, peptídeo não ribossomal. PKS, sintase de poliquetídeo. AT, acetiltransferase; T3PKS, tipo 3 PKS.

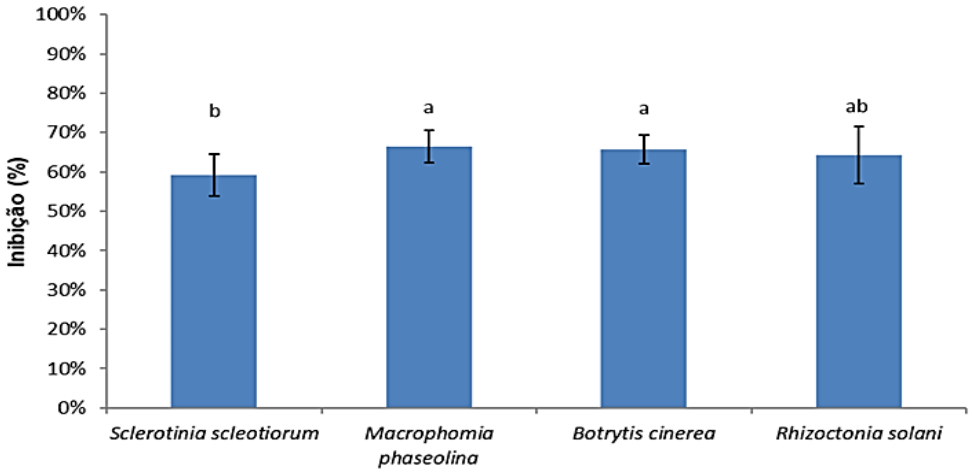
Fonte: TEIXEIRA *et al*., 2020.

O genoma de *B. velezensis* possui apenas 3,9 Mb e algumas rotas complexas para a produção de metabólitos, mostrando que a cepa direciona uma parcela significativa de seu aporte energético para a produção de moléculas de defesa e aquisição de nutrientes. Esse investimento biossintético, operado por complexas rotas de NRPS e PKS, confere à cepa a capacidade de modular a microbiota circundante e resistir a pressões ambientais hostis (CHOWDHURY *et al.*, 2015; RAAIJMAKERS *et al.*, 2010; RABBEE *et al.*, 2019).

3.6 Estado da Arte em Produção de Biomoléculas

As evidências encontradas na literatura sobre a CMRP4490 permitem destacar experimentos *in vitro*, cujos resultados enfatizam seu potencial biotecnológico. Dentre os achados mais significativos, observa-se a atividade antagonista da cepa controlando o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina*, *Botrytis cinerea* e *R. solani* em cerca de 60%, sem diferenças significativas entre os patógenos (TEIXEIRA, M. G. *et al*., 2020) (Figura 8).

Figura 6: Potencial antagônico da linhagem CMRP4490 contra fungos fitopatogênicos



Fonte TEIXEIRA, M. G. *et al*., 2020.

Ensaios de difusão em poço em ágar, utilizando o sobrenadante livre de células, demonstraram a inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, evidenciando a biossíntese de metabólitos secundários com atividade antifúngica. Observou-se que o diâmetro dos halos de inibição é diretamente influenciado pela composição nutricional do meio de fermentação, especificamente, os tratamentos suplementados com triptona como fonte de nitrogênio resultaram em halos estatisticamente superiores, atingindo médias de 34,06 ± 1,47 (GODOY, 2023). Adicionalmente, a integração de mecanismos de regulação celular, formação de biofilme e motilidade, aliada à produção dessas moléculas bioativas, fundamenta a capacidade antagônica da cepa frente a diversos fitopatógenos.

Ensaios de estabilidade térmica, fotossensibilidade e variação de pH foram conduzidos com o sobrenadante livre de células frente ao fitopatógeno *S. sclerotiorum* (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2020). Os resultados indicaram que os metabólitos secundários produzidos pela cepa antagonista apresentaram elevada estabilidade

físico-química sob as condições testadas, tal resiliência é uma característica fundamental para bioprodutos destinados à aplicação em campo, onde a exposição a fatores abióticos é constante (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2020).

A transição dos ensaios laboratoriais para a aplicação prática demonstrou o potencial multifuncional da cepa CMRP4490, tanto na promoção do crescimento vegetal quanto no controle fitossanitário. No que tange à germinação de sementes de soja, o revestimento com a cepa elevou a taxa de germinação de 55,5% para 64% (TEIXEIRA, M. G. *et al*., 2020). As mesmas sementes tratadas, apresentaram redução da incidência de infecção de níveis críticos para 60-66 %, uma redução comparável à fungicidas químicos e pode ser utilizada no manejo integrado, proporcionando controle efetivo de fungos, melhoria da germinação e resistência a condições ambientais adversas.

Seguindo para os processos de *downstream*, segundo *Bertioli,* 2022, a validação da atividade antifúngica do extrato metanólico, este, obtido por extração em fase sólida (Sílica C18) e testado pelo método experimental *Spot on lawn*, apresentou halos de inibição de 24,54 ± 2,31 mm contra *S. sclerotiorum*. Quando comparado a atividade do sobrenadante livre de células (23,375 ± 1,44 mm), o extrato metanólico apresenta baixa variação na capacidade de inibir o fungo alvo, e consequentemente uma purificação parcial da amostra de interesse, retirando interferentes e resíduos do meio de cultivo (BERTOLI, 2022).

O processo de purificação de metabólitos pode ser realizado por meio de diferentes técnicas, em estudos prévios, foi conduzido em colunas manuais empacotadas com sílica C18 (230 - 400 mesh) utilizando um sistema móvel, constituído de uma parte apolar (metanol / acetato [1:1]) e outra polar (metanol / água [1:1]) submetidos a baixa pressão de eluição. De acordo com o perfil químico das amostras obtidas, foram separadas 24 frações, unidas em 8 frações finais. Para a análise do potencial antifúngico, foram realizados ensaios *Spot on lawn*, evidenciando halos de inibição de 21,8 ± 2,17 mm em F4, e 24,4 ± 3,13 mm em F5 (BERTOLI, 2022).

Em suma, o histórico investigativo da cepa CMRP4490 consolida sua eficácia *in vitro* e *in vivo*. Contudo, os processos de extração e purificação, permanecem como etapas não consolidadas, diante deste cenário, a caracterização química e otimização dos processos de purificação são necessários.

3.6.1 Convergência de Evidências ao Escopo da Atual Pesquisa

Apesar da validação do potencial da linhagem *B. velezensis* CMRP4490, a abordagem de uma investigação sistematizada sobre a transição dessas tecnologias para escalas produtivas maiores é essencial. Nesse contexto, o presente estudo investigou a transição do cultivo em frascos agitados para biorreatores de bancada e escala piloto, analisando os impactos dessas mudanças sobre a produção de metabólitos antifúngicos.

Dada a carência de protocolos padronizados para o isolamento de metabólitos secundários, este trabalho abordou a otimização das etapas de recuperação *(downstream*), com um fluxo de purificação relacionado a atividade biológica das amostras, priorizando métodos que otimizaram o tempo de execução e minimizaram o uso de solventes orgânicos. Complementarmente, foi estabelecido as condições ideais para a concentração dos analitos de interesse, assegurando a remoção de interferentes e o efetivo enriquecimento das frações bioativas.

Dessa forma, o conjunto de estratégias implementadas buscou conferir maior previsibilidade e reprodutibilidade ao processo produtivo ao integrar o controle de parâmetros fermentativos e elucidação das moléculas ativas, finalizando o ciclo de investigação, e permitindo correlacionar a estrutura química das moléculas ao seu desempenho fitossanitário.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

A cepa utilizada no desenvolvimento da pesquisa foi a linhagem *Bacillus velezensis* CMRP4490, previamente isolada a partir de amostra ambiental de solo, localizado a 23°19′26,2″S, 51°11′50,5″W, na Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil (HIGASHI, 2020; TEIXEIRA *et al*., 2021). A linhagem é mantida em criopreservação na coleção de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina (LABIM – UEL) e nas Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense (CMRP)

A cepa está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) e seu genoma pode ser acessado no GenBank através do código CP045993.1.

O fitopatógeno alvo utilizado nos experimentos *in vitro* foi o fungo *Macrophomina phaseolina*, a linhagem está depositada na coleção de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina (LABIM – UEL). O fungo *S. sclerotiorum*, utilizado para monitorar atividade antifúngica também está mantido no bando de microrganismos do LABIM.

4.2 CONFECÇÃO DO BANCO DE CÉLULAS

Para a confecção do banco de células de trabalho, a linhagem CMRP4490 foi ativada e repicada em 2 cultivos sucessivos para sincronização e confirmação de pureza no meio de cultura solidificado Ágar Triptona de Soja (TSA), as placas foram incubada em estufa bacteriológica, a 28°C por 24 h. Após os cultivos iniciadores, foi realizada uma fermentação líquida submersa em *Shaker Orbital* à 150 RPM, 28ºC em Erlenmeyers contendo 75mL do meio de cultivo *Tryptic Soy Broth* (TSB) + 0,1% de antiespumante Xiameter AFE, a inoculação foi realizada a partir de uma suspensão celular de colônias puras em solução salina (0,85% m/v cloreto de sódio) com ajuste da turbidez em 0,5 na escala de McFarland (equivalente a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Para montagem dos tubos de estoque foram transferidos 100uL do fermentado para tubos de criopreservação contendo 1,4 mL do meio de cultura estéril

Tryptic Soy Broth (TSB) com adição de 30% glicerol. Os tubos de criopreservação foram mantidos a – 20ºC e criopreservados em ultrafreezer a - 80°C, sendo posteriormente reativados em meio de cultura TSA com crescimento celular acompanhado até 48h para verificação de pureza e viabilidade.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA

4.3.1 Fermentação líquida submersa em agitador orbital

Para a obtenção de biomassa e montagem dos testes, a linhagem CMRP4490 foi ativada e repicada no meio de cultura solidificado Ágar Triptona de Soja (TSA), incubada em estufa bacteriológica, a 28 °C por 24 h para sincronização e confirmação de pureza, após os cultivos iniciadores, foi realizada uma fermentação líquida submersa em *Shaker Orbital* à 150 RPM, 28ºC em *Erlenmeyers* contendo 75mL do meio de cultivo *Tryptic Soy Broth* (TSB) + 0,1% de antiespumante Xiameter AFE, o inoculo de 1% v/v foi realizada a partir de uma suspensão celular de colônias puras em solução salina (0,85% m/v cloreto de sódio) com ajuste da turbidez em 0,5 na escala de *McFarland* (equivalente a aproximadamente 1,5 × 10^8 UFC/mL). A caracterização macromorfológica foi realizada utilizado diferentes meios de cultura solidificados para o cultivo da cepa, estes foram: Ágar Triptona de Soja (TSA), Luria Bertani (LB) e Ágar Base Seletivo *Bacillus cereus* (MYP). Além das diferentes composições nutricionais, foi testada a proporção de ágar presente nos meios de cultura sendo utilizado 1,5% e 2,0% de ágar em sua composição.

4.3.2 Técnica de Cultivo e Registro de Mídias

A técnica utilizada para o inóculo do cultivo foi a de espalhamento por superfície o com Alça de Drigalsky, para isso, uma alíquota de 100 µL da suspensão celular foi depositada na placa de Petri contendo o meio de cultura solidificado, realizando movimentos circulares a solução contendo biomassa bacteriana foi distribuída sobre a superfície do meio de cultura de forma homogênea. O ensaio foi realizado em dois experimentos independentes, sendo cada condição testada em triplicata.

As placas inoculadas foram incubadas ao mesmo tempo a 28 ± 1°C, e

analisadas durante 18, 24, 36 e 48 horas. O intuito deste teste foi discriminar as mudanças durante o período de incubação e diferenças fenotípicas observadas entre as colônias.

A visualização das unidades formadoras de colônias e registro, foi realizado utilizando uma câmera de estereomicroscópio (Leica S6D, Suécia), com o auxílio de uma escala. A partir das fotografias, as colônias foram caracterizadas de acordo com o seu tamanho, formato, tipo de margem (borda), elevação, textura e propriedades ópticas.

4.4 PRODUÇÃO E CINÉTICA DE CRESCIMENTO (*UPSTREAM*)

4.4.1 Fermentação em biorreator de bancada (5 L)

Para o preparo da cultura iniciadora, denominada como *Seed* 1, 300 µL da suspensão salina contendo a biomassa bacteriana foi transferida para frascos *Erlenmeyer* de 100 mL, contendo 30 mL de meio de cultivo MAGO formulado com insumos grau técnico. O cultivo foi incubado a 28 ± 1°C, 200 RPM (agitador orbital Thoth 6430B, Brasil), por 18h.

Para uma fermentação em maior volume, uma alíquota de 1% (v/v) proveniente da cultura iniciadora (*Seed* 1) foi transferido para o Biorreator de 5 litros (Habitat, IKA GmbH, Alemanha) contendo um volume de trabalho de 3 litros do mesmo meio formulado, sob as condições iniciais de agitação a 1000 RPM à 28°C e 0,5 vvm de entrada de ar. Após inoculado, a dorna acoplada ao biorreator foi monitorada com relação a variação de pH, oxigênio dissolvido, temperatura e controlado o nível de espuma automaticamente com adição do antiespumante Xiameter-AFE 1520 (Dow Silicones Corp. Midland, MI).

O preparo do inóculo para a fermentação em escala piloto também foi iniciado com o *Seed* 1 em frascos agitados (*shakers*), enquanto o *Seed* 2 foi conduzido em biorreator de bancada com capacidade de 5 litros (Habitat, IKA GmbH, Alemanha). O cultivo do *Seed* 2 foi interrompido com 20 horas de duração, momento no qual foi utilizado para inocular o biorreator piloto.

A concentração celular e a pureza do inóculo foi avaliada por meio de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) e validação macromorfológica após

diluição seriada em solução salina. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.2 Fermentação em biorreator piloto (100 L)

Para a fermentação em escala piloto, 400 mL do inóculo *Seed* 2 foram inoculados em 40 L de meio de cultura, contidos em um biorreator de 100 L (Engco Bioeng-P). As fermentações foram mantidas por 72 horas sob os seguintes parâmetros controlados: temperatura de 28 ± 0,5°C, aeração mínima de 0,5 vvm, agitação mínima de 200 RPM, pressão de 0,15 bar e oxigênio dissolvido mantido em, no mínimo, 40% de saturação. O controle de espuma foi realizado automaticamente com adição do antiespumante Xiameter-AFE 1520. O ensaio foi realizado em dois experimentos independentes.

4.1 PROCESSAMENTO E PURIFICAÇÃO (*DOWNSTREAM*)

4.1.1 Precipitação Por Ajuste de pH

Para a realização da precipitação química, foi adicionado ao caldo fermentado com células bacterianas, ácido fosfórico 85% até o ajuste de pH desejado. Os frascos com pH ajustado foram mantidos à 4ºC durante a noite para que os componentes solúveis fossem agrupados em agrupamentos insolúveis. Após o período de overnight e nucleação completa das moléculas, foi realizada a separação do pellet e sobrenadante, utilizando a pipeta volumétrica.

Ambas as fases tiverem o pH reajustado à aproximadamente 7.0, reidratadas com água deionizada, congeladas a –80ºC em ultra freezer (SS *Scientific*) e liofilizadas (Liofilizador L101 – Liotop).

4.1.1.1 Otimização da precipitação

Com o intuito de definir a faixa de pH com maior eficiência de separação e menor custo, foram realizadas precipitações ajustando o fermentado à pH 2,0 e pH 4,0. O caldo fermentado utilizado para o ensaio, foi obtido por 2 fermentações independentes em agitador orbital (*shaker*). Após precipitação completa dos

compostos, as amostras foram centrifugadas a 12.007 g (Hitachi, CR21G Himac), durante 15 minutos à 4ºC, reidratadas com água deionizada, reajustadas a pH 7,0, congeladas e liofilizadas para a avaliação da atividade antifúngica.

4.1.2 Extração em Fase Sólida (EFS ou SPE)

O extrato seco de compostos com atividade antifúngica obtido pelo método de precipitação foi submetido a metodologia de Extração em Fase Sólida (EFS/SPE), utilizando seringas com fase estacionária composta por sílica de fase reversa C18. Esse método foi aplicado para o *clean-up* das amostras devido sua alta densidade de ligação, baixo consumo de solventes orgânicos, promovendo perdas mínimas de analito.

As seringas foram acondicionadas com 2 mL de metanol e 2 mL de água, seguindo para a eluição de 25 mg do analito diluído em 10 mL de água deionizada. Ao fim do processo de eluição, foram adicionados 2 mL de água deionizada a coluna, seguindo para a adição de 2 mL de metanol, extraindo os compostos retidos para a fração orgânica metanólica. A coluna foi impulsionada com baixa pressão constante para a eluição do analito.

4.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.1.3.1 Análise analítica por CLAE

As amostras foram analisadas utilizando um HPLC Rigol L-3000 em concentração de 1 mg/mL, com bomba binária, equipado com uma coluna C18 (5 µm, 4 x 250 mm, 100 Å, Lichrospher Knauer) e detector UV – VIS. A coluna foi acondicionada durante 30 minutos, com fluxo de 1 mL/min.

Analisando o perfil químico de cada corrida, foi determinada o melhor método isocrático para a purificação. utilizados os solventes: A (água tipo 1, Miliq Evoqua *Water Technologies*) e B (acetonitrila grau HPLC) com fluxo de 1 mL/min e detecção realiza em 220 nm.

4.1.3.2 Análise preparativa por CLAE

Para o fracionamento do precipitado com atividade antifúngico foi utilizado um HPLC preparativo KNAUER AZURA ASM 2.2L com válvula de injeção manual, detector UV, equipado com uma coluna C18 Eurospher II (5µm 250 x 20 mm, 100 Â), acoplado a um coletor Foxy. A amostra foi diluída na concentração 25 mg/mL e o fracionamento foi realizado com fluxo de 5.00 mL/min, separados em tubos de vidro com uma coletada de 1,5 mL por tubo utilizando um sistema móvel isocrático, constituído por água do tipo 1 (Miliq Evoqua *Water Technologies*) e 70% Acetonitrila (Acetonitrila 99,9+% HPLC Gradiente Chromasolv 4L Riedel) na primeira etapa de fracionamento.

4.1.4 Espectrometria de Massas

4.1.4.1 Espectrometria por MALDI-TOF/MS

A prospecção exploratória de metabólitos do fermentados bruto foi realizada utilizando a técnica MALDI-TOF/MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight) na Universidade Estadual de Maringá.

O preparo das amostras foi feito em suspensão de 1 µL do fermentado bruto em matriz CHCA (alpha-ciano-4-hidroxicinamínico), homogeneizadas, e uma alíquota da amostra transferida para poços da placa de MALDI.

A escolha do método para a caracterização do fermentado justifica-se pela rapidez analítica e pela robustez frente a matrizes complexas. O protocolo empregado permitiu uma triagem eficiente de metabólitos com o mínimo de manipulação, preservando a integridade química dos compostos e possibilitando a identificação de perfis moleculares por meio do software Flex Analysis.

4.1.4.2 Espectrometria por LC-MS

As amostras foram preparadas pelo método de extração em fase sólida para a aquisição pelo método de cromatografia líquida alta eficiência (Shimadzu, Nexera X2, Tóquio, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução quadrupolo híbrido (Impac II, Bruker Daltonics Corporation, Bremen, Alemanha) equipado com

uma fonte de ionização por *eletrospray*, na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

O processamento de dados das amostras purificadas foi realizado pelo software Mzmine 4.9.0 by mzio Gmbh. A detecção de massas foi realizada com os arquivos analisados em modo positivo, a leitura a nível MS1 e MS2 foi feita aplicando o filtro de intensidade para remoção dos ruídos.

Foram estabelecidos como critérios para montagem dos cromatogramas: o limiar de intensidade mínima e no mínimo 5 scans consecutivos para a definição de um pico. A tolerância de massa adotada entre scans foi de 0,002 *m/z* ou 10 ppm.

Para a anotação de metabólitos, os espectros de MS/MS foram vinculados aos seus respectivos íons precursores (MS1) utilizando uma tolerância de massa de 0,01 m/z ou 10 ppm e uma janela de tempo de retenção de 0,6 minutos. A deconvolução dos picos cromatográficos foi refinada exigindo uma altura mínima e duração de pico de até 1,0 minuto e razão de intensidade de pelo menos 2,0 para garantir a pureza do sinal detectado.

Para a simplificação da lista de compostos, aplicou-se o filtro de isótopos de carbono 13 e os dados consolidados em uma matriz única, a correspondência entre sinais de diferentes amostras foi estabelecida com tolerância de massa (5 ppm) e variação temporal máxima de 0,06 minutos. O alinhamento priorizou a exatidão da massa molecular frente à estabilidade do tempo de retenção.

Foram utilizados quatro arquivos de controle, o critério de remoção baseou-se na detecção do sinal em pelo menos dois dos brancos analisados, utilizando a altura máxima do pico como medida de abundância. Para identificar relações entre sinais e reduzir a redundância dos dados, aplicou-se o agrupamento por coeficiente de *Pearson* para avaliar a similaridade de forma e altura dos picos entre as amostras.

Os resultados obtidos através do processamento no Mzmine também foram analisados na plataforma colaborativa *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) utilizando o modulo de *molecular networking* que organiza espectros de massas com base na similaridade entre eles.

4.1.5 Estatísticas

As análises estatísticas realizadas foram: regressão linear utilizando o modelo logístico de quatro parâmetros, teste t de *Welch* (bicaudal), teste post-hoc, análise paramétrica e não paramétrica pelo software R utilizando o pacote agro R.

4.2 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

4.2.1 Quantificação de Células Viáveis e Endósporos

A partir da diluição do caldo fermentado em solução salina (0,85% m/v cloreto de sódio), alíquotas de 100 µL da suspensão celular foram depositadas em placas de Petri de 90 mm contendo o meio de cultura TSA, e utilizando a técnica de espalhamento por superfície com Alça de Drigalsky, o volume foi distribuído de forma homogênea sobre o meio de cultivo solidificado.

A quantificação de endósporos foi realizada pela técnica de tratamento térmico, utilizando os mesmos tubos, para isso, estes foram aquecidos a 80ºC durante 15 minutos em banho maria, após esse período as amostras foram semeadas e incubadas nas mesmas condições de temperatura e tempo já citadas (MORAES, 1993). As contagens foram delimitadas como válidas apenas quando entre 30 e 300 colônias.

Todas as placas resultantes desse teste, foram incubadas em estufa do tipo BOD (*Biological Oxygen Demand*) à temperatura controlada de 28 ± 1°C durante 24 horas.

Uma amostra do fermentado também foi reservada para a leitura de Densidade Óptica (DO) em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 600 nm e diluída de acordo com os limites de detecção do aparelho. Todos os ensaios foram realizados triplicata.

4.2.2 Teste de Poço-difusão em Ágar

Os testes de poço-difusão foram realizados em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo o meio de cultivo BDA (Ágar Batata Dextrose) acrescido de cloranfenicol (100 mg/L) para o acompanhamento da produção de metabólitos e determinação da atividade antifúngica.

Um disco de ágar de 9 mm contendo o micélio ativo do fungo fitopatogênico foi retirado de uma cultura previamente cultivada em BDA, o *spot* foi posicionado no centro da placa, e de forma equidistante, foram perfurados poços de 9 mm utilizando a parte superior de ponteiras de 1000 µL estéreis. Nestes poços, foram depositados

200 µL.

Como controle negativo, foram reservadas três placas contendo apenas o *spot* de fungo, essas foram avaliadas como parâmetro, permitindo acompanhar o crescimento padrão do fungo sem interferência de outros compostos.

Todas as placas resultantes desse teste, foram incubadas em estufa do tipo BOD à temperatura controlada de 25 ± 1°C com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, simulando condições ambientais favoráveis ao crescimento fúngico. A duração do experimento foi determinada a partir do crescimento fúngico observado nas placas controle, quando preenchido completamente a superfície do meio de cultura, o experimento foi interrompido e as placas analisadas utilizando um paquímetro para determinar a medida da área de inibição em milímetros. O ensaio foi realizado em dois experimentos independentes, sendo cada condição testada em triplicata.

4.2.3 Teste de Difusão em Ágar: *Spot on lawn*

A qualificação da atividade inibitória foi realizada por meio de testes *Spot on lawn* contra *M. phaseolina*, em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo o meio de cultivo BDA acrescido de cloranfenicol (100 mg/L). Foram depositados *Spots* do fungo antagonista ao centro da placa e de forma equidistante foram dispostas as amostras diluídas em 10 µL de água deionizada estéril em concentração conhecida e aplicadas em gota sob o meio de cultivo.

Como controle negativo, foram reservadas três placas contendo apenas o *spot* de fungo, essas foram avaliadas como parâmetro, permitindo acompanhar o crescimento padrão do fungo sem interferência de outros compostos.

Todas as placas resultantes desse teste, foram incubadas em estufa do tipo BOD à temperatura controlada de 25 ± 1°C com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, simulando condições ambientais favoráveis ao crescimento fúngico. A duração do experimento foi determinada a partir do crescimento fúngico observado nas placas controle, quando preenchido completamente a superfície do meio de cultura, o experimento foi interrompido e as placas analisadas para determinar a medida da área de inibição em milímetros. O ensaio foi realizado em dois experimentos independentes, sendo cada condição testada em triplicata.

4.2.4 Índice de Crescimento Micelial (ICM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima, foram preparadas soluções em água deionizada estéril da amostra de precipitado nas concentrações: 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL, e a amostra F4 nas concentrações: 365 µg/mL, 182 µg/mL, 91,2 µg/mL, 45,6 µg/mL e 22,8 µg/mL.

Após a diluição, 1 mL de cada amostra foi incorporado a 9 ml de meio BDA em placas de Petri (60 mm) totalizando as seguintes concentrações no meio de cultivo: 50,0 µg/mL, 25,0 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL, e a amostra F4 nas concentrações: 36,5 µg/mL, 18,2 µg/mL, 9,12 µg/mL, 4,56 µg/mL e 2,28 µg/mL.

Um *spot* de 8 mm de diâmetro contendo o micélio de *M. phaseolina* obtidos de uma cultura ativa, foram depositados no centro das placas sobre o meio de cultivo solidificado

Como controle negativo, foram reservadas três placas contendo apenas o *spot* de fungo, essas foram avaliadas como parâmetro, permitindo acompanhar o crescimento padrão do fungo sem interferência de outros compostos.

Todas as placas resultantes desse teste, foram incubadas em estufa do tipo BOD à temperatura controlada de 25 ± 1°C com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, simulando condições ambientais favoráveis ao crescimento fúngico. O crescimento micelial foi avaliado em 24, 48 e 72 horas de incubação e a duração do experimento foi determinada a partir do crescimento fúngico observado nas placas controle. Quando preenchido completamente a superfície do meio de cultura, das placas controle, o experimento foi interrompido, a área contendo o micélio fúngico foi medida em milímetros com um paquímetro e a porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial (ICM) calculada de acordo com Yahyazadeh et al. (2008):

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

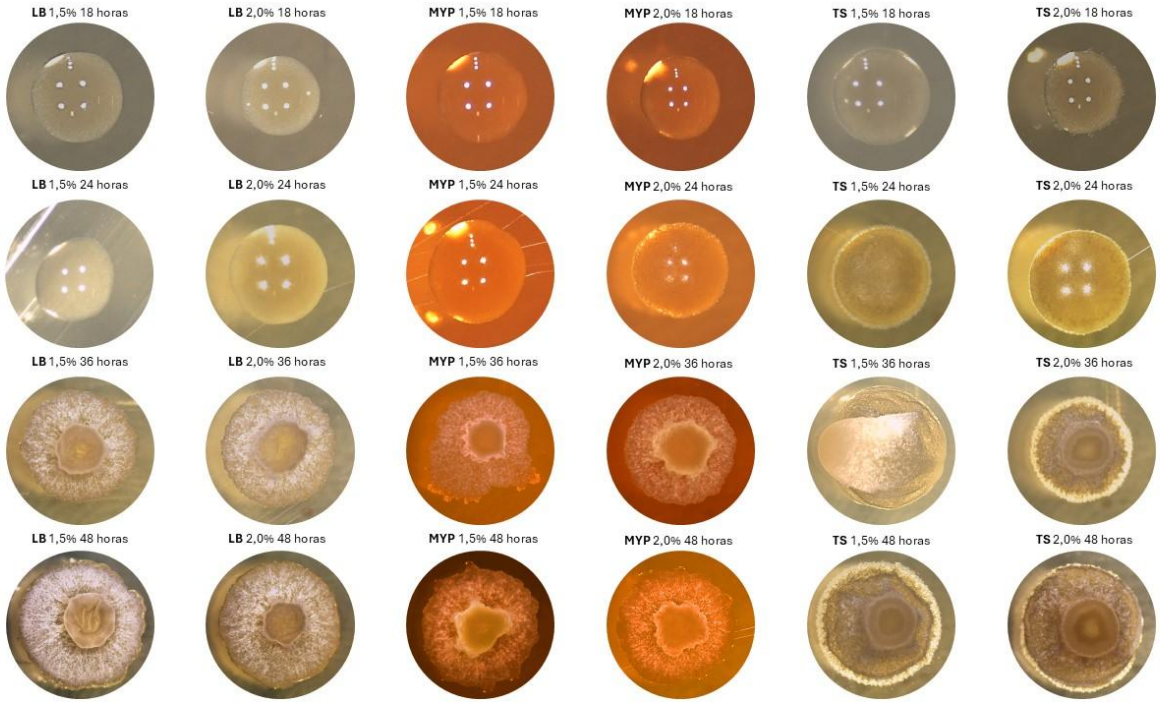
Onde C (mm) é o diâmetro médio da colônia no controle e T (mm) é o diâmetro médio da colônia de cada tratamento. A concentração inibitória mínima foi determinada pela observação da inibição completa do crescimento fúngico. O ensaio foi realizado em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA

O registro das macrocolônias na figura 9 mostram que a mesma cepa pode apresentar pequenas variações em sua morfologia dependendo das condições de cultivo. Com poucas horas de incubação as colônias apresentam-se majoritariamente circulares, com superfície lisa, bordas inteiras e aparência úmida/brilhante e coloração creme, típicas de uma fase de alta hidratação, contudo, após 24 horas de incubação, as colônias assumiram coloração branco-amarelada com textura fosca.

Figura 7: Registro das unidades formadoras de colônias com 18, 24, 36 e 48 horas de incubação.



Fonte: O autor, 2026.

As alterações de superfície, rugosidade e coloração das colônias a partir de 24 horas de incubação, indicam que a complexidade morfológica está associada a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) como polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular (eDNA) e lipídios, estes por sua vez interagem entre si e formam a matriz que envolve as células microbianas (FLEMMING, 2016).

Essa matriz evidencia um processo multicelular coordenado que altera a fisiologia bacteriana e tem diversas funções, como: adquirir nutrientes, reter e proteger

eDNA, ou oferecer sítios de sorção para íons e substâncias hidrofóbicas (FLEMMING, 2023).

Tabela 4: Características das unidades formadoras de colônias com 18 horas de incubação.

Meio de cult.	Tamanho	Forma	Elevação	Bordas	Estrutura	Brilho	Cor	Aspecto
LB 2,0%	≤ 2mm	Circular	Convexa	Lisa	Granulosa	Translúcida	Incolor	Úmida
LB 1,5%	≤ 2mm	Circular	Convexa	Lisa	Granulosa	Translúcida	Incolor	Úmida
MYP 2,0%	≤ 2mm	Circular	Convexa	Lisa	Granulosa	Translúcida	Incolor	Úmida
MYP 1,5%	≤ 2mm	Circular	Convexa	Lisa	Granulosa	Translúcida	Incolor	Úmida
TSA 2,0%	≤ 2mm	Circular	Convexa	Lisa	Granulosa	Translúcida	Incolor	Úmida
TSA 1,5%	≤ 2mm	Circular	Convexa	Lisa	Granulosa	Translúcida	Incolor	Úmida

Fonte: O autor, 2026.

Tabela 5: Características das unidades formadoras de colônias com 24 horas de incubação.

Meio de cult.	Tamanho	Forma	Elevação	Bordas	Estrutura	Brilho	Cor	Aspecto
LB 2,0%	2 a 5mm	Circular	Convexa	Lisa	Granulosa	Opaca	Pigmentada	Úmida
LB 1,5%	2 a 5mm	Circular	Convexa	Lisa	Granulosa	Opaca	Pigmentada	Úmida
MYP 2,0%	2 a 5mm	Circular	Convexa	Lisa	Granulosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa
MYP 1,5%	≤ 2mm	Circular	Convexa	Lisa	Granulosa	Translúcida	Incolor	Úmida
TSA 2,0%	2 a 5mm	Circular	Convexa	Lisa	Granulosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa
TSA 1,5%	2 a 5mm	Circular	Convexa	Lisa	Granulosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa

Fonte: O autor, 2026.

Tabela 6: Características das unidades formadoras de colônias com 36 horas de incubação.

Meio de cult.	Tamanho	Forma	Elevação	Bordas	Estrutura	Brilho	Cor	Aspecto
LB 2,0%	2 a 5mm	Circular	Protuberante	Lobada	Rugosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa
LB 1,5%	≥ 5mm	Circular	Protuberante	Lobada	Rugosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa
MYP 2,0%	2 a 5mm	Circular	Protuberante	Lobada	Rugosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa
MYP 1,5%	≥ 5mm	Irregular	Protuberante	Lobada	Rugosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa
TSA 2,0%	≥ 5mm	Circular	Protuberante	Lobada	Rugosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa
TSA 1,5%	≥ 5mm	Circular	Protuberante	Lobada	Rugosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa

Fonte: O autor, 2026.

Tabela 7: Características das unidades formadoras de colônias com 48 horas de incubação.

Meio de cult.	Tamanho	Forma	Elevação	Bordas	Estrutura	Brilho	Cor	Aspecto
LB 2,0%	≥ 5mm	Circular	Protuberante	Lobada	Rugosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa
LB 1,5%	≥ 5mm	Irregular	Protuberante	Lobada	Rugosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa
MYP 2,0%	≥ 5mm	Irregular	Protuberante	Lobada	Rugosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa
MYP 1,5%	≥ 5mm	Irregular	Protuberante	Lobada	Rugosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa
TSA 2,0%	≥ 5mm	Circular	Protuberante	Lobada	Rugosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa
TSA 1,5%	≥ 5mm	Circular	Protuberante	Lobada	Rugosa	Opaca	Pigmentada	Membranosa

Fonte: O autor, 2026.

No cultivo em TSA, nota-se uma morfologia com diferenciação de cores mais evidente, de acordo com Dunlap *et al.* (2016) algumas linhagens de *Bacillus* já foram

estudadas quanto ao fenótipo exibido quando cultivadas particulares em TSA, apresentando a produção de pigmento escuro em colônias.

As diferentes concentrações de ágar também podem alterar o fenótipo das colônias, quando semeada em ágar 2,0%, exibiram rugosidades mais profundas e verticais, além de bordas bem delimitadas quando comparado as colônias cultivadas em ágar 1,5. O atrito com o substrato de ágar impede fisicamente que o biofilme em crescimento se expanda radialmente e promovem as alterações observadas (FEI *et al.*, 2020).

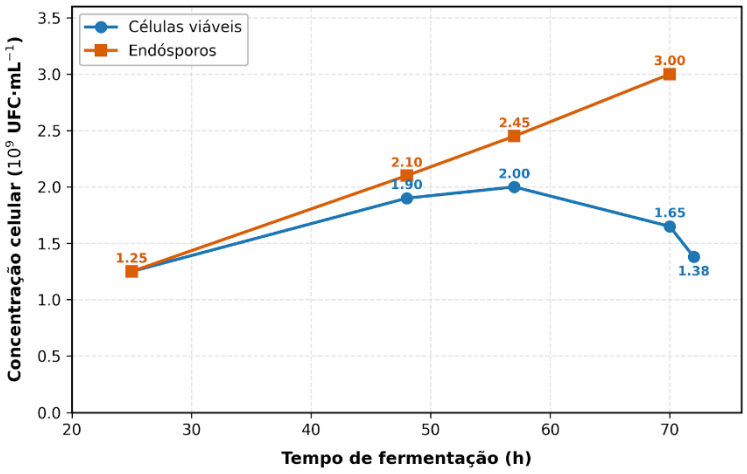
5.2 Produção e Cinética de Crescimento (*Upstream*)

5.2.1 Cinética de Crescimento e Produção de Metabólitos em Biorreator de Bancada

Durante as primeiras horas da fermentação em biorreator de bancada observou-se o aumento da biomassa bacteriana, chegando a 2x10⁹ UFC/mL proximo das 57 horas. A transição da fase estacionária para a fase de declínio ocorre entre 57 e 72 horas, este ponto foi marcado por uma redução acentuada na contagem de células viáveis e aumento progressivo na contagem de endósporos, que atingiu os maiores valores no final da fermentação como observado na figura 10

.

Figura 8: Contagem de células viáveis da fermentação em biorreator de bancada com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico.



Fonte: O autor, 2026.

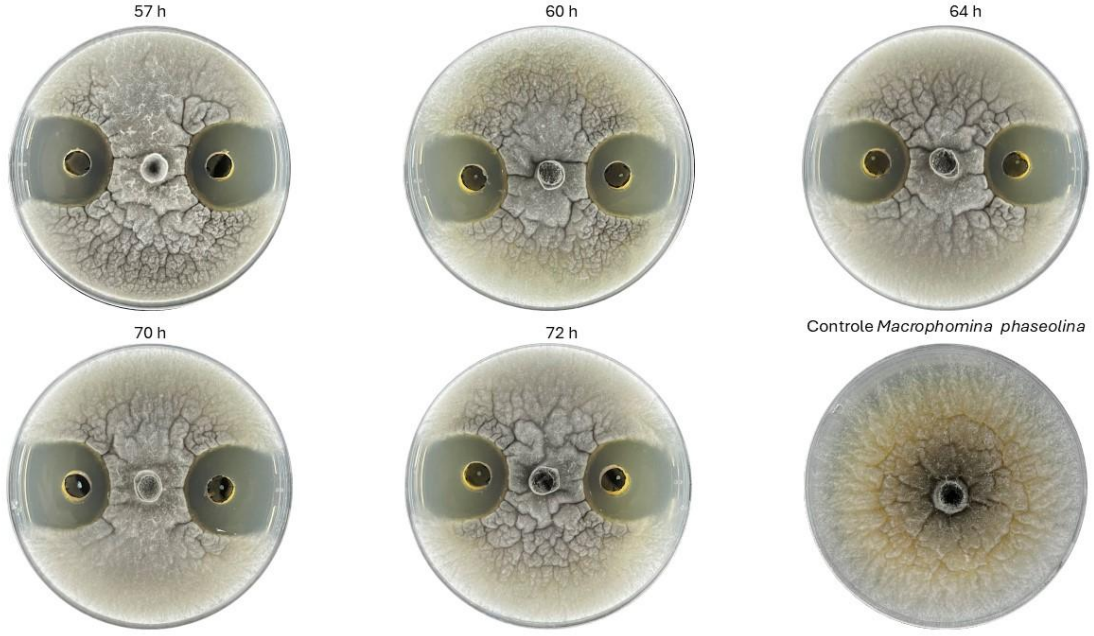
A atividade antifúngica do fermentado alcançou sua maior eficiência com 60 horas de fermentação, apresentando áreas de inibição de 25,63 mm de diâmetro, e uma leve retração no diâmetro do halo em 72 horas (25,05 mm) como mostra a tabela 9.

Tabela 8: Resultado do ensaio microbiológico de poço difusão em ágar contra *M. phaseolina* e amostragem durante a fermentação em Biorreator de bancada IKA com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico.

Tempo de fermentação (h)	Diâmetro médio	Desvio padrão	Coef. de variação
53	23,23	1,10	4,73%
57	25,00	0,35	1,40%
60	25,63	0,04	0,16%
64	25,10	0,57	2,27%
70	26,73	1,10	4,11%
72	25,05	0,49	1,96%

Fonte: O autor, 2026.

Figura 9: Avaliação da atividade antifúngica contra *M. phaseolina* das amostragens durante fermentação em biorreator de bancada IKA com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico.



Fonte: O autor, 2026.
Legenda: Teste de poço difusão em ágar utilizando o meio de cultivo BDA acrescido de cloranfenicol e 200 µL do fermentado bruto (com células) da linhagem CMRP 4490 em diferentes períodos de fermentação. Os números na parte superior de cada placa indicam o tempo em horas de fermentação. Cada placa contém dois poços preenchidos com a mesma amostra; as áreas de inibição do fungo aparecem com coloração translucida, sem a presença do micélio. A placa controle do fungo não apresenta nenhum tipo de tratamento.

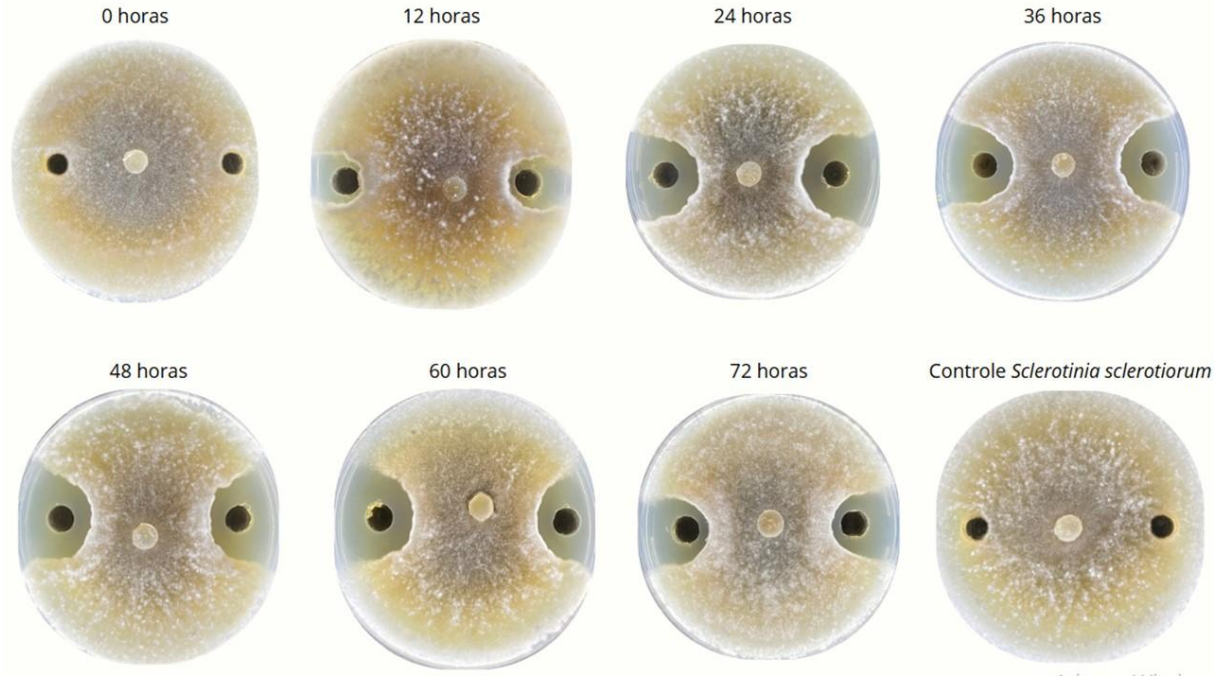
O perfil cinético observado neste trabalho é semelhante ao padrão descrito por Mosquera *et al*. (2014) para *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cultivados em frascos agitados, havendo o aumento atividade antifungica ao longo da fase exponencial,

atingindo o valor máximo na fase estacionária inicial, seguido do declininio na fase estacionária final

5.2.2 Cinética de Crescimento e Produção de Metabólitos em Biorreator Piloto

A análise da cinética de crescimento bacteriano demonstrou uma correlação direta entre o tempo de fermentação e a atividade antifúngica das amostras exemplificadas na figura 12. Observou-se, nas primeiras 12 horas de fermentação, zonas de inibição do crescimento micelial fúngico com 14,54 mm de diâmetro médio, que aumentaram gradualmente até 48 horas atingindo os maiores valores de inibição (24,24 mm).

Figura 10: Avaliação da atividade antifúngica contra *S. sclerotiorum* das amostragens durante a fermentação em Biorreator Piloto com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico (1ª fermentação).



Fonte: O autor.
Legenda: Teste de poço difusão em ágar utilizando o meio de cultivo BDA acrescido de cloranfenicol e 200 µL do fermentado bruto (com células) da linhagem CMRP 4490 em diferentes períodos de fermentação. Os números na parte superior de cada placa indicam o tempo em horas de fermentação. Cada placa contém dois poços preenchidos com a mesma amostra; as áreas de inibição do fungo aparecem com coloração translucida, sem a presença do micélio. A placa controle do fungo não apresenta nenhum tipo de tratamento.

Em 48 horas de fermentação é possível observar o menor índice de variabilidade entre as réplicas, indicando boa confiabilidade dos dados obtidos. Com relação a atividade antifúngica, a maior circunferência média da área de inibição também pode ser observada em 48 horas, portando a produção dos compostos ativos

contra *S. sclerotiorum* chega ao seu limite nesse período seguido por uma fase de declínio.

Com 60 horas de fermentação, se inicia uma tendência de declínio, sugerindo que os nutrientes essenciais podem ter acabado pelo aumento da densidade celular, ou, possivelmente devido à degradação enzimática da amostra, resultando em perda de eficiência biológica, nesse estágio o diâmetro médio dos halos diminui, chegando a 20,03 em 72 horas como mostra a tabela 10.

Tabela 9: Medidas dos halos de inibição contra *S. sclerotiorum* das amostragens durante fermentação em Biorreator Piloto com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico (1ª fermentação).

Tempo de fermentação (horas)	Circunferência média (mm)	Desvio Padrão	Diâmetro (mm)
12	45,68	4,64	~ 14,54
24	68,70	9,87	~ 21,87
36	72,75	5,62	~ 23,16
48	76,15	1,23	~ 24,24
60	69,62	8,00	~ 22,16
72	62,91	3,63	~ 20,03

Fonte: O autor.

A avaliação do crescimento microbiano realizada através da medição da Densidade Óptica (DO) a 600 nm, reflete a concentração de biomassa no meio de cultivo e produtos de seu metabolismo.

Para garantir a precisão dos dados, os valores foram corrigidos subtraindo a absorbância do meio de cultivo estéril, que apresentou uma turbidez inicial significativa, típica de meios complexos. As medidas estão apresentadas na tabela 11.

Tabela 10: Medidas de densidade óptica da 1ª fermentação em biorreator piloto com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico.

Amostras	DO (600nm)	DO - Branco
Meio de cultivo estéril	0,903	-
Seed 1 (Erlenmeyer)	6,58	5,677
Seed 2 (Biorreator)	5,635	4,732
Fermentado (Biorreator) 72h	24,627	23,725

Fonte: O autor.

Ao final da fermentação, observa-se um aumento substancial na densidade celular, confirmando que as condições físico-químicas fornecidas pelo biorreator foram favoráveis para o aumento da biomassa microbiana e seu metabolismo. Para garantir a precisão dos dados, os valores foram corrigidos subtraindo-se a absorbância do meio de cultivo estéril

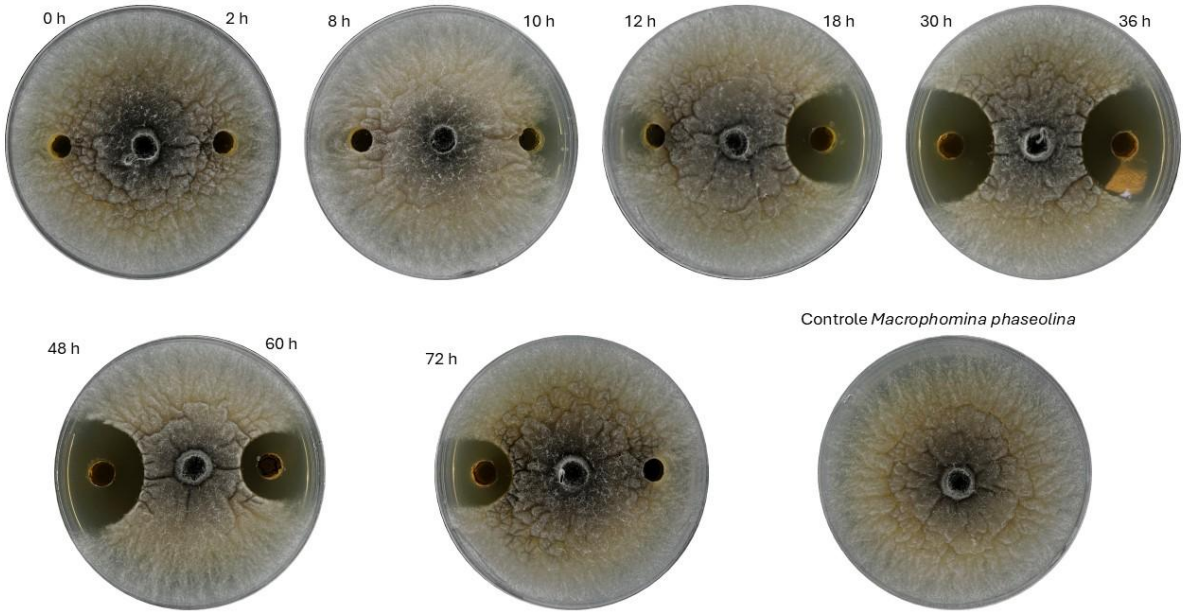
A segunda fermentação em biorreator piloto testada contra *M. phaseolina*, é caracterizada pela síntese de substâncias bioativas de forma expressiva no intervalo entre 36 e 48 horas, momento em que o zona de inibição se estabiliza em seu valor máximo de 32,80 mm, após esse período, é possível indicar uma diminuição da atividade dos compostos antifúngicos como mostra a tabela 12 e figura 13.

Tabela 11: Medidas dos halos de inibição contra *M. phaseolina* das amostragens durante fermentação em biorreator piloto com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico (2ª fermentação).

Tempo de fermentação em horas	Diâmetro mm
18	25,10
30	31,60
36	32,80
48	32,80
60	22,00
72	20,70

Fonte: O autor, 2026.

Figura 11: Avaliação da atividade antifúngica contra *M. phaseolina* das amostragens durante fermentação em biorreator piloto com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico (2ª fermentação).



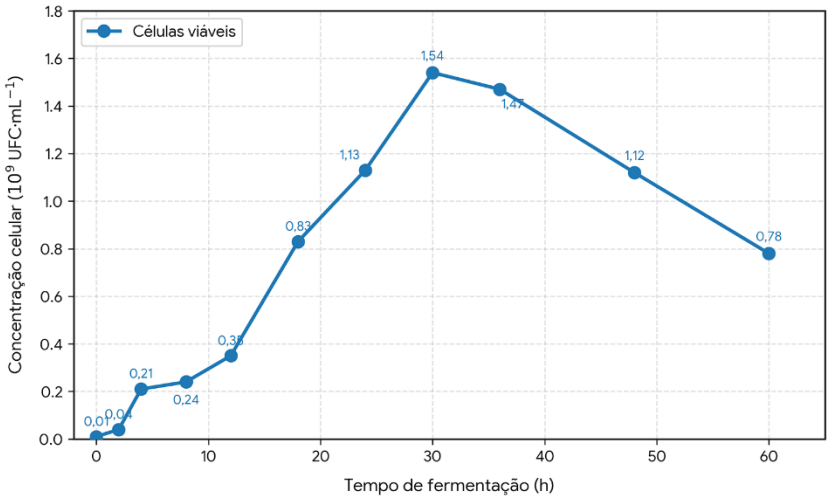
Fonte: O autor, 2026.

Legenda: Teste de poço difusão em ágar utilizando o meio de cultivo BDA acrescido de cloranfenicol e 200 µL do fermentado bruto (com células) da linhagem CMRP 4490 em diferentes períodos de fermentação. Os números na parte superior de cada placa indicam o tempo em horas de fermentação. A placa de 72 horas foi reanalisada com amostra liofilizada e diluída na concentração de 20 mg/200 µL. Cada placa (com exceção da placa de 72 horas) contém dois poços preenchidos com a mesma amostra; as áreas de inibição do fungo aparecem com coloração translucida, sem a presença do micélio. A placa controle do fungo não apresenta nenhum tipo de tratamento.

A partir destes resultados, podemos inferior que o microrganismo alcançou sua capacidade máxima sob as condições de cultivo oferecidas, ou que houve saturação

dos compostos no meio, equilibrando as taxas de difusão e concentração.

Figura 12: Contagem de células viáveis da 2ª fermentação em biorreator piloto com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico.

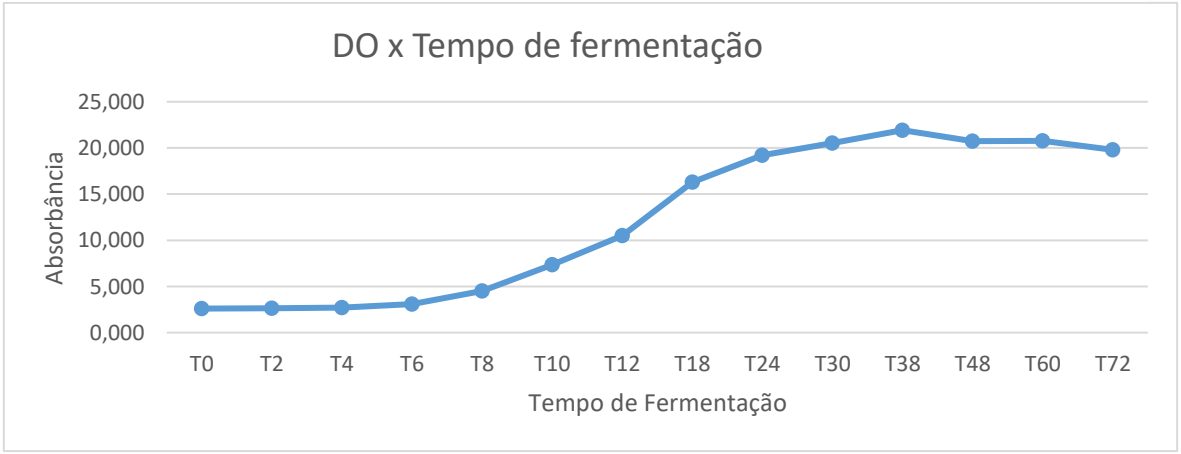


Fonte: O autor, 2026.

Ambas as fermentações em biorreator piloto demonstraram reprodutibilidade, evidenciada pela similaridade nas avaliações de compostos antifúngicos, onde a máxima eficácia biológica foi atingida no intervalo de 48 horas independentemente do fitopatógeno alvo (*S. sclerotiorum* ou *M. phaseolina*), indicando que a concentração dos compostos ativos no meio MAGO é tempo-dependente e está atrelado ao platô de biomassa.

A queda acentuada da atividade inibitória após 48 horas de cultivo é o ponto crítico em ambas as fermentações, a correlação entre a redução dos halos, diminuição da viabilidade celular (UFC) e densidade óptica (DO) (figura 15) sugere que a integridade dos compostos antifúngicos é sensível à fase de declínio da cultura, possivelmente devido à lise celular e subsequente liberação de enzimas no meio.

Figura 13: Medidas de densidade óptica da 2ª fermentação em biorreator piloto com meio MAGO formulado com insumos de grau técnico.



Fonte: O autor, 2026.

Ao comparar os processos fermentativos, observou-se que em ambas as escalas de produção (bancada e piloto) apresentaram uma manutenção robusta da atividade antifúngica.

5.3 Precipitação Por Ajuste de pH

5.3.1 Otimização da Precipitação Ácida com Fermentado em *Shaker*

Para avaliar a resposta do sistema em diferentes acidezes e determinar o melhor pH para a execução da precipitação ácida, as amostras foram divididas em dois grupos: pH 2,0 e pH 4,0.

A precipitação ácida neste módulo foi realizada com o fermentado da linhagem CMRP4490 em *shaker*, obtendo duas fases (sobrenadante e precipitado) com solubilidades diferentes, ambos foram testados contra *M. phaseolina* para avaliação da atividade antifúngica, e dentre eles, apenas o precipitado apresentou atividade antifúngica nas duas faixas de pH.

Os diâmetros dos halos de inibição foram comparados entre pH 2,0 e pH 4,0 por teste t de *Welch* (bicaudal), adequado para amostras independentes sem assumir homogeneidade de variâncias. Observou-se uma sobreposição entre os grupos, com valores médios semelhantes e ausência de diferença estatisticamente significativa Assim, dentro do intervalo avaliado, o pH não alterou de forma detectável a atividade antimicrobiana expressa pelo halo de inibição

Tabela 12: Medida dos halos de inibição resultante de 200ul do precipitado obtido pelo ajuste de pH do fermentado, no teste de poço difusão contra *M. phaseolina* em placas de 90 mm contendo meio BDA + 0,1% cloranfenicol.

Amostra	Diâmetro	Rendimento (mg)	Diâmetro médio (mm)	Desvio Padrão
pH 2,0	31,25	160	31,06	0,85
pH 2,0	31,00	164		
pH 2,0	30,00	125		
pH 2,0	32,00	118		
pH 4,0	31,30	146	31,23	0,73
pH 4,0	30,90	167		
pH 4,0	30,50	118		
pH 4,0	32,20	121		

Comparação (teste t de Welch, bicaudal): t(≈5,8) ≈ −0,33, p ≈ 0,75 → sem diferença significativa (α = 0,05).

Fonte: O autor, 2026.

Legenda: As amostras denominadas como pH 2,0 representam 4 amostras independentes que passaram pelo processo de acidificação no pH especificado. As amostras denominadas como pH 4,0 representam 4 amostras de 80 mL independentes que passaram pelo processo de acidificação no pH especificado.

Tabela 13: Medida dos halos de inibição do precipitado pelo ajuste de pH do fermentado, no teste *Spot on Lawn* contra *M. phaseolina* em placas de 90 mm contendo meio BDA + 0,1% cloranfenicol na concentração 1 mg/10 µL.

Amostra	Diâmetro médio (mm)	Desvio Padrão
pH 2,0	29,35	1,42
pH 4,0	28,92	1,43

Nota: Comparação (teste t de Welch, bicaudal): t(14) ≈ 0,60, p ≈ 0,56 → sem diferença significativa (α = 0,05).

Fonte: O autor, 2026.

Os diâmetros médios dos halos de inibição obtidos no teste *Spot on Lawn* contra *M. phaseolina* foram comparados por teste t de *Welch* (bicaudal), indicando que as médias foram próximas e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Portanto, na mesma concentração, as amostras ajustadas a pH 2,0 e 4,0, não resultou em alteração detectável na atividade antimicrobiana, estimada pelo halo de inibição. Entretanto, como a diferença média foi pequena e havendo variabilidade intragrupo, estudos com maior número de réplicas e repetição em dias distintos podem ser necessários para aumentar a robustez da inferência.

Ao converter pH em concentração molar de íons hidrogênio, observa-se que as amostras ajustadas a pH 2,0 apresentaram valores de 7,08 x 10^{-3} contra 7,25x 10^{-5} quantificado nas amostras ajustadas para pH 4, representando uma diferença de cerca de 100 vezes. A variação relativa de íon de hidrogênio entre réplicas é mais expressiva na faixa de pH 2,0, indicando que pequenas diferenças de pH nessa região correspondem a alterações significativas da acidez efetiva da solução.

Tabela 14: Cálculos estatísticos para otimização da precipitação ácida com o fermentado da linhagem CMRP4490 em *shaker*.

Amostra	Variação de pH/µL	Média conc. de íons [H+] (mol·L⁻¹)	Desvio P. (mol·L⁻¹)	C.V
pH 2,0	$-1{,}17\times10^{-2}$			
pH 2,0	$-1{,}64\times10^{-2}$	$7{,}08\times10^{-3}$	$0{,}802\times10^{-3}$	11,33%
pH 2,0	$-7{,}27\times10^{-3}$			
pH 2,0	$-7{,}38\times10^{-3}$			
pH 4,0	$-1{,}37\times10^{-2}$	$7{,}25\times10^{-5}$	$0{,}325\times10^{-5}$	4,48%
pH 4,0	$-1{,}40\times10^{-2}$			

pH 4,0	$-2{,}10\times10^{-2}$
pH 4,0	$-2{,}12\times10^{-2}$

Fonte: O autor, 2026.

Além de variação do pH, foi calculado a variação de pH por µL de ácido adicionado, a variação negativa de pH/µL indica uma tendência de acidificação constante em ambos os grupos, embora com magnitudes distintas.

Os resultados apresentados na Tabela 15 mostram que o grupo mantido em pH 4,0 exibiu maior consistência experimental, evidenciada pelo CV de 4,48%, o que sugere precisão nas medições de pH nesta faixa e maior equilíbrio iônico dos lipopeptídeos presentes no extrato nessa condição.

Já as amostras ajustadas a pH 2,0 apresentaram maior dispersão com um CV de 11,33% sugere que condições de acidez extrema podem induzir fenômenos como a desnaturação parcial de resíduos proteicos, gerando instabilidade nas leituras.

Tabela 15: Volume de ácido adicionado ao caldo fermentado para ajuste de pH.

Amostra	pH pré acidificação	Adição de ácido fosfórico 85% em uL	pH final
pH 2,0	6,20	350	2,09
pH 2,0	6,24	250	2,15
pH 2,0	6,21	550	2,21
pH 2,0	6,22	550	2,16
pH 4,0	6,19	150	4,13
pH 4,0	6,23	150	4,13
pH 4,0	6,23	100	4,13
pH 4,0	6,29	100	4,17

Fonte: O autor, 2026.

5.3.2 Otimização da Precipitação Ácida com Fermentado em Biorreator de Bancada.

Com o intuito de avaliar a metodologia de precipitação ácida com um produto fermentado em biorreator, o processo foi executado novamente com os mesmos parâmetros para a avaliação da resposta do sistema em diferentes acidezes alterando apenas a origem do caldo fermentado (extrato bruto).

Tabela 14: Volume de ácido e base adicionados ao caldo fermentado para ajuste de pH.

Amostra (80 mL)	Volume em mL de ácido fosfórico 85% adicionado	pH pós acidificação	Volume em mL de NaOH 1M adicionado
pH 2,0	0,50	2,25	4,00
pH 2,0	0,70	2,23	4,00
pH 2,0	0,80	2,33	4,20
pH 2,0	0,70	2,27	4,00
pH 4,0	0,20	4,20	2,00
pH 4,0	0,25	4,31	1,50
pH 4,0	0,20	4,06	1,20
pH 4,0	0,10	4,23	1,80

Fonte: O autor, 2026.

A partir da tabela 16, é possível observar que em pH 2,0, a média da concentração de íons hidrogênio está em torno de $5{,}39\times10^{-3}$ mol/L com um coeficiente de variação (CV) baixo (10,06%), indicando consistência nas medições. Já em pH 4,0, a concentração média é menor (~$6{,}45\times10^{-5}$ mol/L), porém com maior variação (CV 24,69%)

Tabela 15: Cálculos estatísticos para otimização da precipitação ácida com fermentado da linhagem CMRP4490 em biorreator de bancada.

Amostra	Média da conc. de íons [H+] (mol/L)	Desvio P. (mol/L)	CV
pH 2,0	$5{,}39\times10^{-3}$	$5{,}42\times10^{-4}$	10,06%
pH 2,0			
pH 2,0			
pH 2,0			
pH 4,0	$6{,}45\times10^{-5}$	$1{,}59\times10^{-5}$	24,69%.
pH 4,0			
pH 4,0			
pH 4,0			

Fonte: O autor, 2026.

A partir dos resultados obtidos pelo ensaio microbiológico de poço difusão em ágar, pode-se concluir que o diâmetro médio das amostras aumenta com a diminuição do pH, passando de 26,89 mm no extrato bruto para cerca de 31,6 mm em pH 2,0 e 4,0. Essa diferença sugere que, com a acidificação do extrato bruto, alteram-se as propriedades físico-químicas fazendo com que moléculas parcialmente negativas se tornem positivamente carregadas, promovendo assim a formação de flocos, além da

atração entres os compostos por forças de Van der Waals, fazendo com que decante no fundo do recipiente (Venkataraman et al., 2022)., onde apenas essa porção decantada mantenha a capacidade de inibição do fungo alvo.

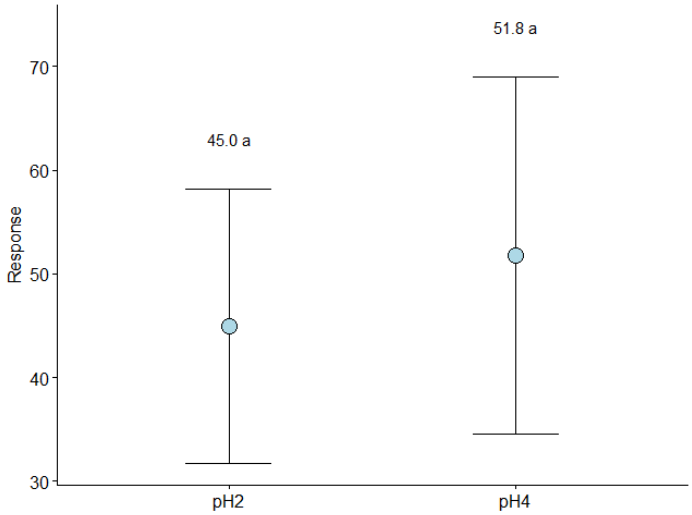
A baixa variabilidade (CV entre 2,05% e 3,26%) indicou boa reprodutibilidade dos resultados e confiabilidade das medidas.

Tabela 16: Resultado do ensaio microbiológico poço difusão em ágar e avaliação da atividade antifúngica de 200 µL dos produtos da precipitação ácida por meio das medidas de inibição do crescimento fúngico.

Amostra	Diâmetro médio (mm)	Desvio Padrão (mm)	CV (%)
Extrato Bruto	26,8875	0,55	2,05%
pH 2,0	31,625	1,03	3,26%
pH 4,0	31,875	1,03	3,23%

Fonte: O autor, 2026.

Figura 14: Análise não paramétrica utilizando a medida da área dos halos de inibição no teste de poço difusão do precipitado contra *M. phaseolina*.



Nota: As letras iguais acima dos intervalos indicam que não houve diferença significativa a p<0,05 (teste post-hoc).

Fonte: O autor, 2026.

Ademais, a similaridade dos diâmetros médios entre pH 2,0 e 4,0 sugere que dentro dessa faixa o efeito do pH sobre o diâmetro é pouco diferenciado e a análise estatística indica que não houve diferença estatística significativa entre os precipitados obtidos em pH 2 e pH 4.

5.3.3 Comparação de atividade entre fermentados pós extrações

Os resultados dos ensaios de difusão em ágar revelam variações significativas

na inibição do fungo quanto na reprodutibilidade experimental. Ao analisar a capacidade de inibição através do diâmetro dos halos, observa-se que a amostra do Precipitado PA do fermentado em *shaker* (A2) apresentou maior inibição (média = 35,558 mm), seguida pela amostra do Precipitado PA (A1) do fermentado em biorreator de bancada (média = 34,775 mm). A amostra do Precipitado PA após a Extração em Fase Sólida (A5) do fermentado em biorreator de bancada, obteve o menor halo registrado (média = 30,158 mm), esta redução de aproximadamente 13% no diâmetro sugere erros experimentais

Figura 17: Teste de *Spot on lawn* comparando a atividade do fermentado bruto e precipitado da precipitação ácida contra *M. phaseolina* com concentração amostral 500 µg/10 µL.



Fonte: O autor, 2026.
Legenda: Teste de poço difusão em ágar utilizando os precipitados e sobrenadante obtidos por acidificação na concentração de 20 mg/200 µL da linhagem CMRP 4490 de diferentes fermentações. Cada placa contém dois poços preenchidos com a mesma amostra denominada; as áreas de inibição do fungo aparecem com coloração translucida, sem a presença do micélio. A placa controle do fungo não apresenta nenhum tipo de tratamento. Amostra A1: Fração precipitada por ajuste de pH a partir do fermentado em biorreator de bancada; A2: Fração precipitada por ajuste de pH a partir do fermentado em *shaker*; A3: Fração sobrenadante por ajuste de pH a partir do fermentado em biorreator de bancada; A4: Fração sobrenadante por ajuste de pH a partir do fermentado em *shaker*; A5: Fração precipitada por ajuste de pH a partir do fermentado em biorreator de bancada após extração em fase sólida.

Tabela 17: Resultado do ensaio microbiológico de poço difusão em ágar, utilizando uma concentração de amostra conhecida (20 mg/200 µL) e avaliação da atividade antifúngica contra *M. phaseolina* dos extratos de diferentes fermentações.

Amostra	Diâmetro médio (mm)	Desvio Padrão	C.V.
A1 (P.PA IKA)	34,775	1,37	3,99%
A2 (P.PA ERLEN)	35,558	1,27	3,60%
A5 (P.PA + EFS IKA)	30,158	0,56	1,87%

Fonte: O autor, 2026.
Legenda: Medidas obtidas pelo teste de poço difusão em ágar utilizando os precipitados e sobrenadante obtidos por acidificação na concentração de 20 mg/200 µL da linhagem CMRP 4490 de diferentes fermentações. Amostra A1: Fração precipitada por ajuste de pH a partir do fermentado em biorreator de bancada; A2: Fração precipitada por ajuste de pH a partir do fermentado em *shaker*; A3: Fração sobrenadante por ajuste de pH a partir do fermentado em biorreator de bancada; A4: Fração sobrenadante por ajuste de pH a partir do fermentado em *shaker*; A5: Fração precipitada por ajuste de pH a partir do fermentado em biorreator de bancada após extração em fase sólida.

No que tange à estabilidade e confiabilidade dos dados, é possível destacar a amostra A5 como a mais estável do conjunto, com um CV de apenas 1,87% e o menor desvio padrão (0,56 mm), apresentando uma homogeneidade superior às amostras A1 (CV 3,99%) e A2 (CV 3,60%).

É crucial considerar, no entanto, as limitações intrínsecas ao método de difusão em ágar para inferir a eficácia antifúngica real. A redução do halo observada na amostra A5 pode não refletir uma perda de atividade fungicida, mas sim uma alteração na propriedade físico-química da amostra, como um aumento na viscosidade que dificulta a difusão do princípio ativo através da rede polimérica do ágar.

Ao comparar os resultados no teste *Spot on lawn*, nota-se que as médias dos halos entre os três grupos sofrem pouca variação, contudo, o diâmetro dos halos do extrato bruto mostrou-se como a condição mais eficiente (14,40 mm), indicando assim, que o potencial inibitório pode ser influenciado pelo grau complexidade da amostra, permitindo que haja efeitos sinérgicos entre os compostos com atividade antifúngica ou que houve uma pequena perda de compostos no processo.

Tabela 18: Médias das inibições no ensaio *spot on lawn* contra *M. phaseolina* com concentração amostral 500 µg/10 µL

Amostra	Diâmetro médio (mm)	Desvio Padrão	C.V. %
Extrato Bruto	14,40	1,85	12,87
Precipitado P.A. Bio.	13,93	1,38	9,90
Precipitado P.A. Erlen.	14,09	1,65	11,70

Fonte: O autor, 2026.

O coeficiente de variação do Precipitado P.A. Bio. o aponta como o grupo de resultados mais consistentes e reprodutíveis, já o extrato bruto apresentou a maior variabilidade, enfatizando os pontos já abordados com relação a atividade inibitória.

A precipitação de metabólitos secundários produzidos por *Bacillus* em resposta a alteração do meio para um pH ácido é um fenômeno documentado na literatura, metabólitos como a surfactina tem sua estabilidade afetada pelo pH abaixo de 5, sendo observada sua precipitação devido à acumulação de metabólitos ácidos extracelulares e reduzindo sua concentração em meio líquido (WEI et al., 2003).

Portanto, o ajuste do pH ácido para a precipitação de metabólitos secundários de *Bacillus* é aplicada principalmente para a recuperação e purificação de compostos como biossurfactantes e lipopeptídeos (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008). Além de

ser uma técnica eficiente para a concentração de metabólitos sem a utilização de solventes tóxicos, é economicamente viável podendo ser implementada para aplicações industriais.

5.3.4 Índice de Crescimento Micelial (ICM) do Precipitado

Os resultados obtidos no teste de inibição do crescimento micelial demonstram que o precipitado (obtido por precipitação ácida em pH 4,0) do fermentado em biorreator de bancada, apresenta potencial eficácia antifúngica e dose-dependente contra o fitopatógeno *M. phaseolina*. Observa-se que a eficácia inibitória é diretamente proporcional ao aumento da concentração do composto, com um gradiente de resposta que se acentua conforme a dosagem dobra em cada tratamento.

Tabela 19: Porcentagem de inibição do precipitado obtido por precipitação ácida no teste de inibição do crescimento micelial contra *M. phaseolina*.

Concentração µg/mL	% inibição 24h	% inibição 48h	% inibição 72h
50	76,1	84,3	87,7
25	66,7	72,6	70,2
12,5	34,6	44,4	41,7
6,25	25,2	28,5	25,3

Fonte: O autor, 2026.

A dosagem de 50,0 µg/mL impediu que o fungo estabelecesse mecanismos de compensação ou crescimento radial secundário durante as 72 horas de incubação, a inibição pode estar associada à produção de metabolitos, que danificam a membrana celular do fungo (TORRES et al., 2016).

Além disso, a degradação do DNA fúngico por metabólitos secundários tem sido relatada como um mecanismo importante para a inibição do crescimento de *M. phaseolina*, evidenciando um efeito citotóxico direto desses compostos (MYO et al., 2021).

Nas outras concentrações, nota-se um padrão distinto de resposta, na dose de 25,0 µg/mL, por exemplo, a inibição recuou de 72,6% para 70,2%. O aumento do crescimento do fungo nas concentrações mais baixas ao longo do tempo indica que o microrganismo pode superar parcialmente o efeito inibitório com exposição

prolongada (ONGENA; JACQUES, 2014).

Figura 15: Teste ICM com precipitado contra *M. phaseolina* após 72 horas de incubação.



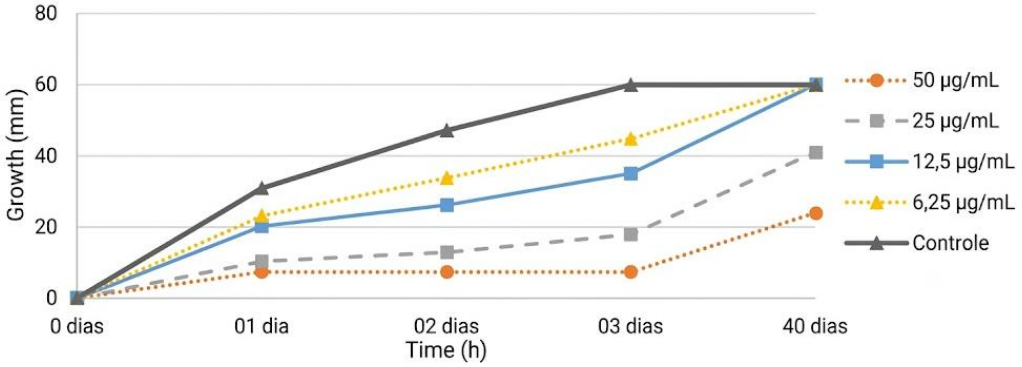
Fonte: O autor, 2026.

Entre as concentrações de 12,5 µg/mL e 25,0 µg/mL é observado um ponto crítico de eficácia, neste intervalo encontra-se a concentração mínima necessária para um controle superior a 50% do crescimento.

Esses dados corroboram com a confirmação do método de precipitação ácida para a separação de compostos com atividade. A manutenção de índices de inibição próximos a 90% na maior dosagem qualifica a amostra como um agente promissor para o controle de *M. phaseolina*, demonstrando estabilidade contra o micélio do patógeno sob condições *in vitro*.

Após 40 dias de incubação, as placas foram reavaliadas, notou-se o crescimento do fungo em todas as concentrações, como mostra a figura 22.

Figura 16: Curva de crescimento fúngico durante 40 dias na presença de diferentes concentrações do precipitado no teste de inibição do crescimento micelial contra *M. phaseolina***.**



Fonte: O autor, 2026.

A partir destes dados, o gráfico abrangendo o intervalo de tempo analisado, possibilitou a observação da progressão do crescimento micelial.

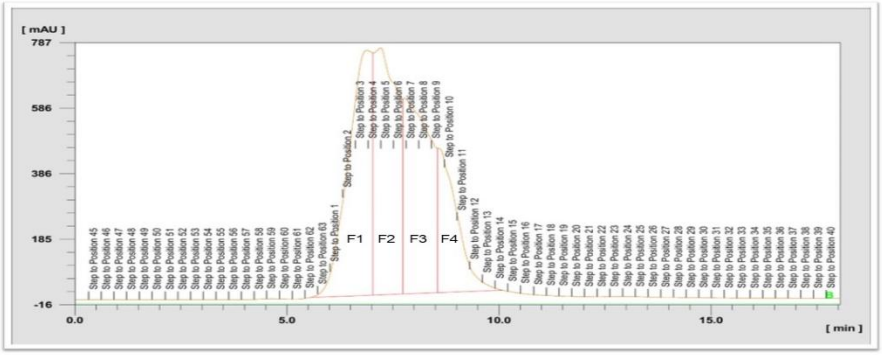
Avaliar a relação dose-resposta e a duração da inibição, possibilita o entendimento do potencial antifúngico do precipitado e sua aplicabilidade prática. Comparações com outros estudos indicam que efeitos similares de dose-resposta são frequentes em agentes antifúngicos naturais e sintéticos, reforçando a relevância da concentração para o controle efetivo do patógeno (YE *et al*., 2017).

5.4 ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS POR CLAE

O fracionamento do precipitado foi marcado pelo início da eluição dos compostos a partir de aproximadamente 5.5 min, e fim da eluição em aproximadamente 11.0 min. O tempo de aquisição para cada amostra injetada com volume de injeção de 25 mg/mL foi de 18 minutos, o perfil cromatográfico das amostras foi obtido e monitorado entre corridas, possibilitando a separação da matriz complexa em quatro frações iniciais denominadas F1, F2, F3 e F4 como mostra a figura 23.

Fonte: O autor, 2026.

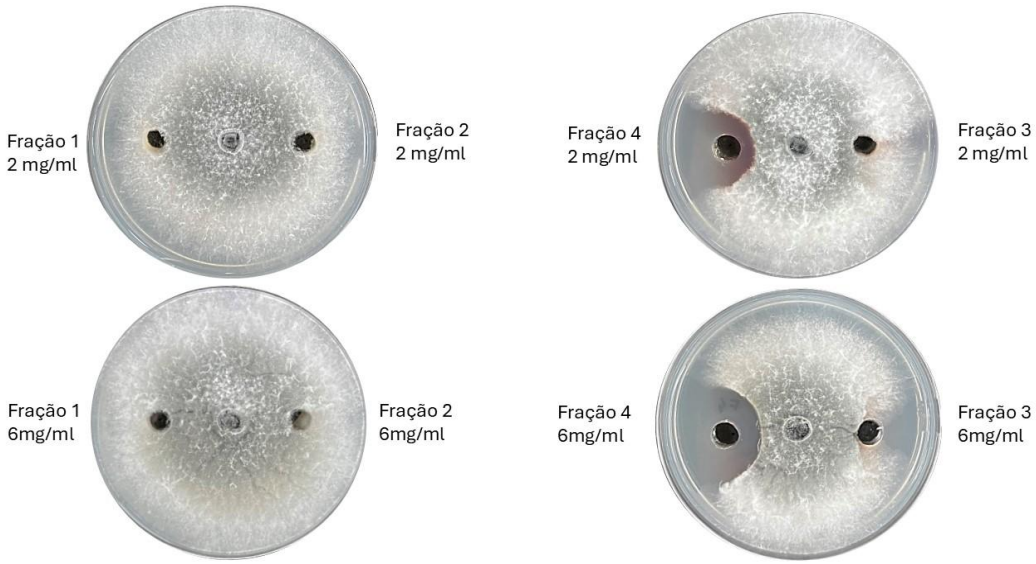
Figura 17: Exemplo de análise do precipitado em HPLC semipreparativo e os 4 picos referentes as frações: F1, F2, F3 e F4, separados pelas linhas definidas pelo software para cada pico respectivamente.



Dentre as frações iniciais, apenas a fração 4, com rendimento de 0,022g (a cada fracionamento) apresentou atividade nos testes *in vitro* contra *M. phaseolina*, como mostra a figura 24.

Fonte: O autor, 2026.

Figura 18: Teste de poço difusão em ágar contra *M. phaseolina* com as frações obtidas a partir do primeiro fracionamento em HPLC.



Considerando o sistema isocrático e a composição da coluna cromatográfica, o intervalo de eluição de 8,5 a 10 min aponta para a presença de metabólitos com carcaterísticad de substâncias anfifílicas, como os lipopeptídeos, cuja porção apolar volumosa (caudas de ácidos graxos) promove uma forte interação hidrofóbica com a fase estacionária (HUANG *et al*., 2016; KALISZAN *et al*., 2002).

A fração F4 foi submetida à um segundo fracionamento, utilizando um sistema móvel composto por 85% de acetonitrila e 15% de água Mili-Q, resultando em 12 frações que tiveram seu perfil químico analisado por CLAE analítica, os cromatogramas podem ser observados nos anexos.

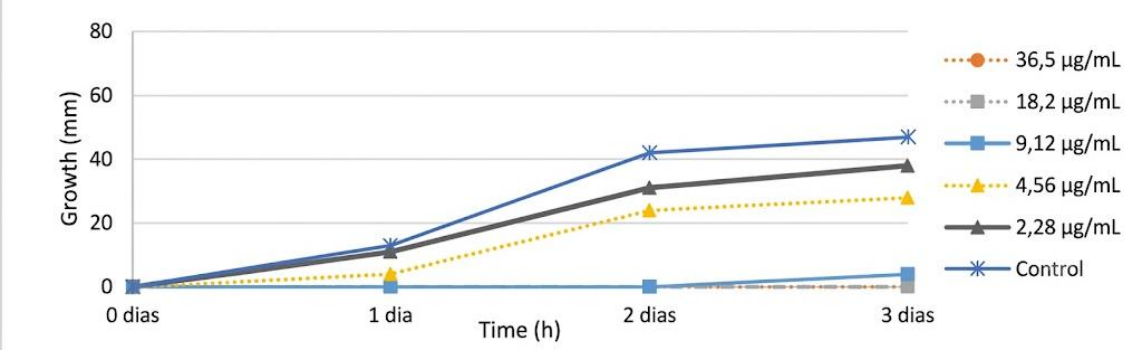
5.4.1 Índice de Crescimento Micelial (ICM) da fração F4

Os resultados do teste apresentado na figura 25, mostram que as concentrações mais altas (36,5 e 18,25 µg/mL) resultaram em controle total do fungo, enquanto nas concentrações a partir de 9,125 µg/mL, mostram aumento progressivo do crescimento micelial, indicando a diminuição do efeito inibitório. A amostra controle, sem nenhum tratamento, apresenta o maior crescimento, confirmando a eficácia das

doses testadas na redução do desenvolvimento do micélio.

Fonte: O autor, 2026.

Figura 19: Curva de crescimento fúngico na presença de diferentes concentrações da fração F4 por precipitação ácida no teste de inibição do crescimento micelial contra *M. phaseolina*.

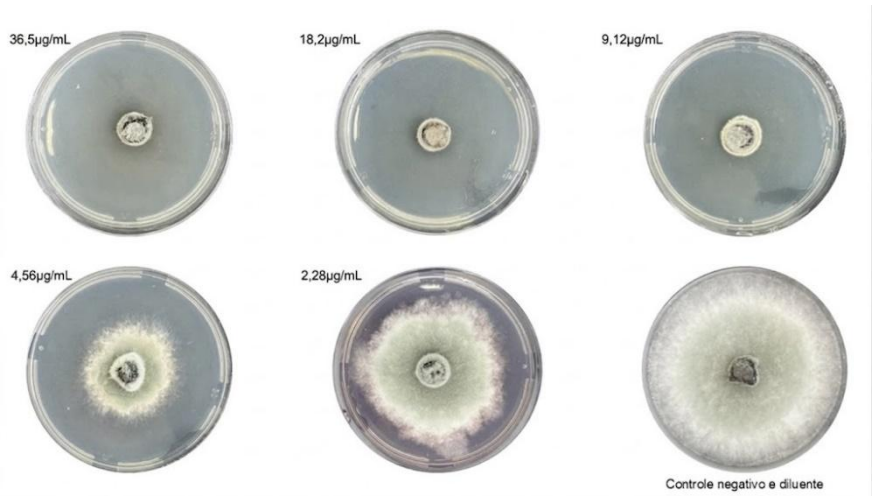


Os dados foram submetidos à análise de regressão linear utilizando o modelo logístico de quatro parâmetros, apresentando alta aderência estatística R^2 de 0,9944 ($p < 0,0001$). O ponto de partida metabólico (mPOD) situou-se em 13,52, com limites de confiança entre 11,8 e 16,24. O erro padrão residual de 2,817 confirma a precisão das observações experimentais em relação à curva ajustada.

A análise do experimento indica uma interação rápida entre os estados de crescimento e inibição total conforme a dose é incrementada, contudo, a variação no crescimento do fungo entre as concentrações intermediárias sugere uma possível indução das respostas adaptativas do fungo alvo, esse fenômeno é amplamente discutido por Garzon et al. (2011) e Brent e Hollomon (2007), mostrando que em níveis de controle mais baixos há a redução da eficácia, favorecendo o desenvolvimento de resistência em fitopatógenos como *M. phaseolina*.

Fonte: O autor, 2026.

Figura 20: Teste ICM com fração F4 contra *M. phaseolina* após 72 horas de incubação.



5.5 ANOTAÇÃO DOS METABÓLITOS

5.5.1 Caracterização de Lipopetídeos por MALDI-TOF

Por meio da técnica de espectrometria de massas, foi possível identificar picos com razão massa carga semelhantes à de alguns lipopeptideos com atividade antifúngica.

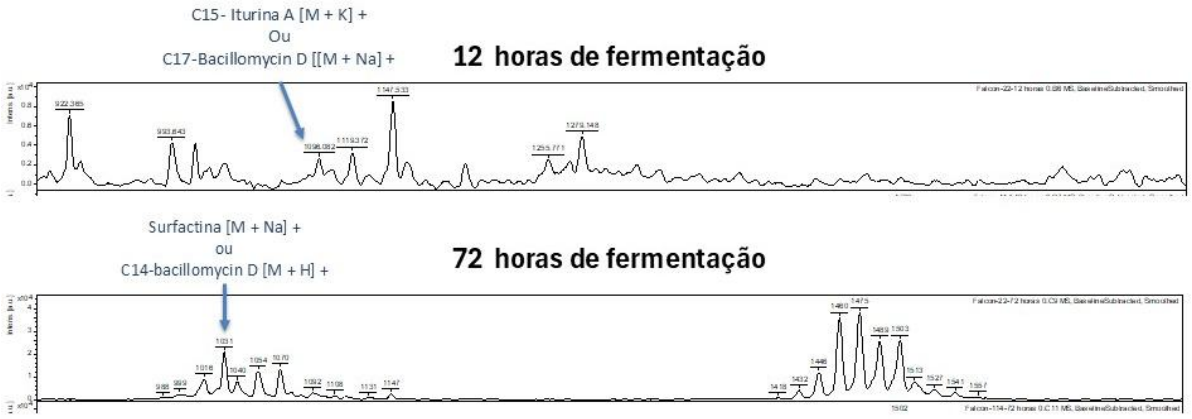
Fonte: O autor, 2026.

Especificamente, o pico observado 1096,08 m/z sugere uma ambiguidade positiva, podendo corresponder tanto à C15-Iturina A, na forma de aduto de potássio [M + K] +, quanto à C17-Bacillomycin D como aduto de sódio [M + Na]+. Ambas as moléculas são típicas de gêneros como *B. velezensis,* reforçando a identidade taxonômica e o potencial de biocontrole da cepa em estudo.

Tabela 20: Comparação de massas observadas na literatura e massas obtidas pela análise do fermentado em *shaker* da linhagem CMRP4490, utilizando o método de aquisição de massas MALDI-TOF.

Nome do composto	m/z ref.	m/z	Aducto	Microrganismo	Referência
C15- Iturin A	1095,53	1096.08	[M + K] +	*Bacillus velezensis*	WANG et al. 2021
Surfactina	1030,68	1031.00	[M + Na] +	*Bacillus* spp. (MT1-MT5)	CHEN et al., 2020
C14-Bacillomycin D	1031.54	1031,00	[M + H] +	*Bacillus subtilis*	SILVA et al., 2026
C17-B					

Figura 21: Espectros obtidos utilizando método de aquisição de massas MALDI-TOF e indicação de compostos pela similaridade da razão massa carga.



Fonte: O autor, 2026.

5.5.1 Identificação de metabólitos

O pré-processamento dos dados brutos obtidos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-MS/MS) foi inicialmente conduzido utilizando o *software* MZmine, contudo, ao submeter o conjunto de dados processados à busca de correspondência contra bibliotecas espectrais locais e de referência, não foram obtidas identificações diretas e conclusivas para os analitos de interesse.

Diante da ausência de correspondências diretas no processamento local, recorreu-se à plataforma colaborativa *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) utilizando os dados brutos e os arquivos de *features* exportados e analise comparativa manual entre os valores de m/z.

A análise dos espectros (anexados nos apêndices) indicou que a linhagem CMRP4490 produziu moléculas com relação massa carga (m/z) que podem ser relacionados a lipopeptídeos cíclicos de diferentes famílias previamente descritas no gênero *Bacillus*, como: surfactinas, iturinas.

Foram detectados os valores de razão massa carga: 993.4868, 1007.5030, 1021.5191, 1035.5291, e 1063.5649, a natureza hidroxilada das cadeias laterais indicam que os compostos detectados podem ser pertencentes à família das surfactinas. Esses compostos estavam presentes em diversas frações da porção ativa F4, na tabela abaixo é possível observar as frações que as apresentaram em maior intensidade.

Tabela 21: Análise espectrométrica de compostos similares à surfactina.

Razão m/z	Fração	Intensidade	Tempo de retenção (min)
993.4868	F7F4	1.6E4	09.79
1007.5030	F7F4	1.1E4	10.94
1021.5191	F7F4	3.4E5	12.05
1035.5291	F9F4	4.5E4	12.76
1049.5496	F7F4	8.2E4	13.55
1063.5649	F7F4	3.0E4	13.93

Fonte: O autor, 2026.
Legenda: Razão m/z: Representa a razão entre a massa atômica exata do íon detectado e sua respectiva carga. Fração: Identificação da amostra purificada ou coletada via cromatografia líquida. Intensidade: Refere-se à abundância relativa do íon detectada pelo espectrômetro, os valores estão expressos em notação científica. Tempo de Retenção: Tempo decorrido, expresso em minutos (min), entre a injeção da amostra e a detecção do pico máximo no detector cromatográfico que reflete a hidrofobicidade de cada homólogo.

As análises indicam a provável presença de homólogos da micosubtilina

pertencentes à família da iturina com picos de íons moleculares [M + H]+ com valores de: 1043.5014, 1057.5139, 1071.5312, 1085.5469, correspondendo a cadeias de ácidos graxos hidroxilados.

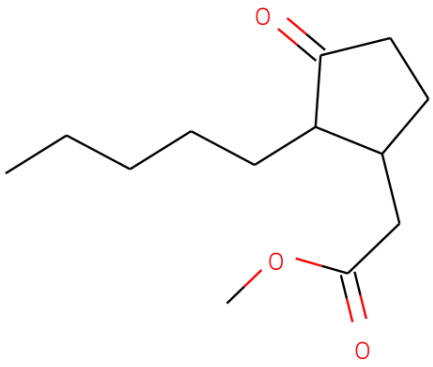
Tabela 22: Análise espectrométrica de compostos similares à iturina

Razão m/z	Fração	Intensidade	Tempo de retenção (min)
1043.5014	F3F4	3.0E4	12.07
1057.5139	F7F4	3.2E4	12.93
1071.5312	F7F4	3.1E4	13.43
1085.5469	F7F4	1.5E4	13.93

Fonte: O autor, 2026.
Legenda: Razão m/z: Representa a razão entre a massa atômica exata do íon detectado e sua respectiva carga. Fração: Identificação da amostra purificada ou coletada via cromatografia líquida. Intensidade: Refere-se à abundância relativa do íon detectada pelo espectrômetro, os valores estão expressos em notação científica. Tempo de Retenção: Tempo decorrido, expresso em minutos (min), entre a injeção da amostra e a detecção do pico máximo no detector cromatográfico que reflete a hidrofobicidade de cada homólogo.

Além dos compostos manualmente correlacionados, a análise pelo GNPS identificou o (1R,2R)-methyl dihydrojasmonate com alto nível de confiança. Essa molécula é relevante do ponto de vista biotecnológico, pois, tem uma estrutura análoga ao jasmonato de metilo, um fitohormônio crucial na sinalização de defesa e regulador de crescimento vegetal (PER *et al*. 2018)

Figura 22: Estrutura química do (1R,2R)-methyl dihydrojasmonate



Fonte: GNPS, 2026.

A presença desse composto nas frações purificadas confirma que *B. velezensis* CMRP4490 tem capacidade de atuar como indutora de resistência sistémica adquirida nas plantas, contribuindo para uma resposta mais rápida e eficiente ao ataque de patógenos.

6 CONCLUSÃO

O estudo confirmou o elevado potencial biotecnológico da linhagem *Bacillus velezensis* CMRP4490 na produção de metabólitos secundários com atividade antifúngica. A caracterização macromorfológica revelou fenótipos rugosos e opacos, indicativos da produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e formação de biofilme atributos essenciais para o desempenho antagônico da cepa.

Em relação aos parâmetros fermentativos, os ensaios em biorreatores (bancada e piloto) demonstraram que a síntese de bioativos está diretamente atrelada ao platô de biomassa. A análise dos resultados indica a possibilidade de diminuição de tempo produção, maximizando a recuperação das moléculas de interesse com maior agilidade, reduzindo custos operacionais sem comprometer a eficácia do bioprocesso.

Na etapa de *downstream*, a precipitação ácida em pH 4,0 foi validada como um método de concentração eficiente, estável e economicamente viável quando comparada a extração em pH 2,0, que além de utilizar maiores volumes de ácido também carece da adição de uma solução básica para o reajuste do potencial hidrogenionico. O precipitado ideal (pH 4,0) obtido exibiu efeito dose-dependente contra *Macrophomina phaseolina*, alcançando 87,7% de inibição (50,0 µg/mL)

A detecção de metabólitos com atividade antifúngica e da molécula análoga ao Jasmonato de metilo, reforça o papel multifuncional dessa bactéria tanto na promoção do crescimento vegetal quanto no biocontrole de patógenos.

Dessa forma, os resultados obtidos destacam *B. velezensis* CMRP4490 como uma estirpe promissora para aplicações agrícolas sustentáveis, atuando simultaneamente como agente indutor de resistência em plantas e como produtor de compostos com atividade antimicrobiana, o que amplia seu potencial de uso em estratégias integradas de manejo fitossanitário.

REFERÊNCIAS

ABBAS, H. K. et al. Respostas fitotóxicas da soja (*Glycine max* L.) à botryodiplodina, uma toxina produzida pelo fungo da doença da podridão do carvão, *Macrophomina phaseolina*. **Toxins**, v. 12, n. 1, p. 25, 2020.

ABBEY, J. A. et al. Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*) – prospects and challenges. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, p. 207–228, 2019.

ALI, S. S.; WAKTE, P. S. Biofilm formation and siderophore production by *Pseudomonas Aeruginosa* isolated from wounds infection. **International Journal of New Technology and Research**, v. 2, n. 9, p. 20-23, 2016.

AMAÍZ, L. et al. Evaluación del efecto antagonista de un consorcio bacteriano sobre *Rhizoctonia solani* Kühn en cultivos de arroz. **Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal**, v. 6, n. 1, p. 19-30, 2017.

AMSELEM, J. et al. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **PLoS Genetics**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. e1002230, 2011.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos**. [S. l.]: ANVISA, 2024. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos. Acesso em: 24 abr. 2024.

BAILLY, C. Insights into the Bioactivities and Mechanism of Action of the Microbial Diketopiperazine Cyclic Dipeptide Cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl). **Applied Sciences**, v. 12, n. 9, p. 4505, 2022. Disponível em: https://www.mdpi.com/2076-3417/12/9/4505. Acesso em: 6 mar. 2026.

BANDARA, Y. M. A. Y. et al. O fungo necrotrófico *Macrophomina phaseolina* promove a suscetibilidade ao apodrecimento do carvão no sorgo granífero através de enzimas induzidas que degradam a parede celular do hospedeiro. **Fitopatologia**, v. 108, n. 8, p. 948-956, 2018.

BANDARA, A. Y. et al. Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. e0231141, 2020. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231141.

BARBOSA DA SILVA, J. H.; PIRES, J. M.; FERREIRA, L. P.; AMARAL, C. S.; RODRIGUES, M. P. Uso de bioestimulantes na cultura do milho (Zea mays L.): uma revisão.Scientific Electronic Archives, v. 16, n. 5, 2023. DOI: 10.36560/16520231664.

BHATTACHARYA, D. et al. A inibição da germinação de sementes por *Macrophomina phaseolina* está relacionada à produção de faseolinona. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 2, p. 129-133, 1994.

BHATTACHARYA, D. et al. Phytotoxic Metabolites of *Macrophomina Phaseolina*. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, v. 22, n. 1, p. 54–57, 1992.

BHATTACHARYA, D.; DHAR, T. K.; ALI, E. An Enzyme Immunoassay of Phaseolinone and Its Application in Estimation of the Amount of Toxin in *Macrophomina Phaseolina* Infected Seeds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1970–74, 1992.

BHATTACHARYA, G. et al. Ação mutagênica da faseolinona, uma micotoxina isolada de *Macrophomina phaseolina*. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 40, n. 4, p. 349-353, 1987.

BITANCOURT, A. A. Uma nova doença do feijão. **O Biológico**, v. 1, n. 2, p. 41, fev. 1935.

Boland, G. J., & Hall, R. (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *16*(2), 93–108. https://doi.org/10.1080/07060669409500766

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

BORGES, A. F. et al. *Thielaviopsis ethacetica* the etiological agent of sugarcane pineapple sett rot disease in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, p. 460-467, 2019.

BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Resistência a fungicidas**: a avaliação do risco. Bruxelas: FRAC, 1988. (Monografia FRAC, 2).

BUAINAIN, A. M.; GARCIA, J. R.; VIEIRA FILHO, J. E. R. A economia agropecuária do Matopiba. **Estudos Sociedade e Agricultura**, v. 26, n. 2, p. 376-401, 2018.

BUTCHER, R. A. et al. The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. **PNAS**, v. 104, n. 5, p. 1506-1509, 2007.

CAI, Y. et al. Iron depletion prevents biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through twitching mobility and quorum sensing. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 37-41, 2010.

CEPEA. CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **PIB Agronegócio de Cadeias - 2023**. Piracicaba: CEPEA, 2024. Disponível em: https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx. Acesso em: 23 abr. 2024.

CHAMBERS, M. et al. Um conjunto de ferramentas multiplataforma para espectrometria de massa e proteômica. **Nature Biotechnology**, v. 30, p. 918–920, 2012.

CHOWDHURY, S. P. *et al.* Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. **Frontiers in Microbiology**, [*s. l.*], v. 6, p. 780, 2015.

CHEN, J.-Y. et al. Bioactive Compounds from the Fruits of *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18551-18569, 2015. DOI: 10.3390/molecules201018551.

CHEN, X. H. et al. Análise comparativa da sequência completa do genoma da bactéria promotora do crescimento de plantas *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1007–1014, 2007.

CHIARAMONTE, J. B.; MENDES, L. W.; MENDES, R. Rhizosphere Microbiome and Soil-Borne Diseases. In: GUPTA, V. V. S. R.; SHARMA, A. K. (org.). **Rhizosphere Biology**: Interactions Between Microbes and Plants. Singapore: Springer, 2020. p. 155-168.

COLUSSI, J.; LANGEMEIER, M. Colheita de soja nos EUA começa sem sinais de compras chinesas, enquanto o Brasil estabelece recorde de exportação. **farmdoc daily**, v. 15, n. 173, 22 set. 2025.

CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. Fundamentos e desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. In: LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. (org.). **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. Recife: EDUFRPE, 2018. p. 1-16.

CORREIA, R. M. et al. Analysis of Robusta coffee cultivated in agroforestry systems (AFS) by ESI-FT-ICR MS and portable NIR associated with sensory analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 94, 2020.

CROPLIFE INTERNATIONAL. **Time and Cost of new agrochemical product discovery, development and registration**. [S. l.]: AgbioInvestor, 2024.
DE CAL, A. et al. Uso de biofungicidas para o controle de doenças de plantas visando melhorar a disponibilidade de alimentos. **Agricultura**, v. 2, p. 109–124, 2012.

DERBYSHIRE, M. et al. Hemibiotrophic strategy in the necrotrophic white mold fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 8, p. 1260, 2017.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and Pathology of Macrophomina Phaseolina**. [S. l.: s. n.], 1978.

DUNLAP, C. A. et al. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*... **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1212-1217, 2016.

EL-GHAREEB, M. S. et al. Antifungal, antiaflatoxigenic, and cytotoxic properties of bioactive secondary metabolites derived from *Bacillus* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1-15, 2023.

EL-GHAREEB, M. S. et al. Profiling of antifungal activities and in silico studies of natural polyphenols from some plants. **Plants**, v. 10, n. 6, p. 1104, 2021.

EMBRAPA. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil 1999/2000**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. (Documentos, 132).

ERENTAL, A. et al. *Sclerotinia sclerotiorum* adenylate cyclase is required for sclerotial development and is involved in virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 311-322, 2008.

ESPIGA, Z.; CAO, X.; ZHANG, H. Produção de iturina A por *Bacillus velezensis* ND e suas características de controle biológico. **Journal of Basic Microbiology**, v. 63, p. 179-189, 2023.

FAOSTAT. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **Food and agriculture data**. Roma: FAO, 2024. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/. Acesso em: 23 abr. 2024.

FÁTIMA, A. de et al. Antifungal activity of goniothalamin enantiomers. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 5, n. 2, p. 118-121, 2008. DOI: 10.2174/157018008783406732.

FEI, C. et al. O crescimento não uniforme e o atrito superficial determinam a morfologia do biofilme bacteriano em substratos macios. **PNAS**, v. 117, n. 14, p. 7622-7632, 2020.

FISHLOW, A. **Agricultura e indústria no Brasil**: inovação e competitividade. Brasília: IPEA, 2017.
FLEMMING, H. C. EPS - ontem e hoje. **Microorganisms**, v. 4, p. 41, 2016.

FLEMMING, H. C. et al. A matriz do biofilme: multitarefa em um espaço compartilhado. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, p. 70–86, 2023.

GARCIA, V. G.; ONCO, M. P.; SUSAN, V. R. Biologia e sistemática da forma gênero *Rhizoctonia*. **Periodical Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 55–79, 2006.

GARUD, A. et al. A Scientific Review of Pesticides: Classification, Toxicity, Health Effects, Sustainability, and Environmental Impact. **Cureus**, 2024.

GASQUES, J. G. et al. Total factor productivity in Brazilian agriculture. In: FUGLIE, K. O. et al. **Productivity growth in agriculture**: an international perspective. Oxfordshire: CAB International, 2012.

GHARSALLAH, H. et al. Antifungal potential of Bacillus strains: implications for biocontrol strategies in food safety and sustainable agriculture. Frontiers in Microbiology, v. 16, art. 1615252, 2025. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1615252.

GLICK, R. et al. Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 2973-2980, 2010.

GOWRI, M. et al. Inhibitory efficacy of cyclo(L-leucyl-L-prolyl) from mangrove rhizosphere bacterium - *Bacillus amyloliquefaciens* (MMS-50) - against cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 84, p. 167-174, 2017.

HALPERN, H. C. et al. First Report of Fusarium Wilt of Cotton Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Race 4 in Texas, U.S.A. **Plant Disease**, v. 102, n. 2, p. 446, 2018.

HARRISON, F.; BUCKLING, A. Siderophore production and biofilm formation as linked social traits. **The ISME Journal**, v. 3, p. 632-634, 2009.

HENRIQUE, F. H. et al. Classificação das raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijoeiro. **Bragantia**, v. 74, n. 1, p. 84-92, 2015.

HERTLEIN, G. et al. Production of the catechol type siderophore bacillibactin by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, e108272, 2014.

HILLOCKS, R. J.; WALLER, J. M. Soilborne diseases and their importance in tropical agriculture. In: HILLOCKS, R. J.; WALLER, J. M. (ed.). **Soilborne Diseases of Tropical Crops**. Wallingford: CAB International, 1997. p. 3-16.

HOUARI, A. et al. Reologia de biofilmes formados na superfície de membranas de nanofiltração em uma unidade de produção de água potável. **Biofouling**, v. 24, n. 4, p. 235–240, 2008.

HUANG, Yining; NIE, Yongxin; BOYES, Barry; ORLANDO, Ron. Resolving Isomeric Glycopeptide Glycoforms with Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). **Journal of Glycomics & Lipidomics**, v. 6, n. 1, p. 137-142, 2016. DOI: 10.4172/2153-0637.1000137.

JOGAIAH, S. et al. Isolation and evaluation of proteolytic actinomycete isolates as novel inducers of pearl millet downy mildew disease protection. **Scientific Reports**, v. 6, p. 30789, 2016.

KABBAGE, M. et al. The life and death of a plant cell: apoptosis and necrotrophy. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1-11, 2015.

KAJIMURA, Y.; SUGIYAMA, M.; KANEDA, M. Bacilopeptinas, novos antibióticos lipopeptídicos cíclicos de *Bacillus subtilis* FR-2. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 10, p. 1095–1103, 1995.

KALISZAN, Roman et al. Gradient HPLC in the determination of drug lipophilicity and acidity. **Journal of Chromatography A**, v. 965, n. 1-2, p. 117-127, 2002.

KAUR, S. et al. Carbohydrate Degrading Enzyme Production by Plant Pathogenic Mycelia and Microsclerotia Isolates of *Macrophomina Phaseolina* through Koji Fermentation. **Industrial Crops & Products**, v. 36, n. 1, p. 140–48, 2012.

KAUR, S. et al. Emerging Phytopathogen *Macrophomina Phaseolina*: Biology, Economic Importance and Current Diagnostic Trends. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 136–51, 2012.

KAUR, S. et al. Fed-batch production of vanillin by *Bacillus aryabhattai* BA03. **BMC Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 77, 2017.

KHAKIMOV, A. A.; OMONLIKOV, A. U.; UTAGANOV, S. B. U. Situação atual e perspectivas do uso de biofungicidas contra doenças de plantas. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 119–126, 2020.

KHAN, A. et al. *Bacillus* spp. as Bioagents: Uses and Application for Sustainable Agriculture. **Biology**, v. 11, n. 12, p. 1763, 2022. DOI: 10.3390/biology11121763.
KHAN, A. N. et al. Identificação molecular e caracterização genética de cepas de *Macrophomina phaseolina* causadoras de patogenicidade em girassol e grão de bico. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

KHAMBHATI, V. H. et al. Primeiro relato da produção de micotoxinas e outros metabólitos secundários por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. isolados de soja (*Glycine max* L.) sintomáticos com doença da podridão do carvão. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 332, 2020.

KUPPER, K. C.; BELLOTTE, J. A. M.; GOES, A. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum* agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1004-1015, 2009.

LAI, M. W.; LIOU, R. F. Dois genes que codificam xilanases GH10 são essenciais para a virulência do patógeno vegetal oomiceto *Phytophthora parasitica*. **Current Genetics**, v. 64, p. 931-943, 2018.

LANGEMEIER, M. Referências internacionais para a produção de soja. **farmdoc daily**, v. 14, n. 43, 1 mar. 2024.

LANGEMEIER, M.; COLUSSI, J. Aumento da dívida agrícola e estresse financeiro: Evidências do Barômetro da Economia Agrícola. **Centro de Agricultura Comercial de Purdue**, 4 fev. 2026.

LANGEMEIER, M.; COLUSSI, J. O sentimento dos agricultores cai drasticamente no início de 2026 com o aumento das preocupações econômicas. **Centro de Agricultura Comercial de Purdue**, 3 fev. 2026.

LANUBILE, A. et al. Transcriptome profiling of soybean (*Glycine max*) roots challenged with pathogenic and non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. **BMC Genomics**, v. 16, 2015.

LAZAREVIC-PAŠTI, T. et al. With or Without You?—A Critical Review on Pesticides in Food. **Foods**, 2025.

LEONOV, V. V. et al. Mikrobnye siderofory: struktura, svojstva, funkcii [Siderophores of microbes: structure, properties and functions]. **Astrahanskiy Meditsinskiy Zhurnal**, v. 11, n. 4, p. 24-37, 2016.

LI, M.-Z. et al. Antifungal activity of gallic acid in vitro and in vivo. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 7, p. 1039-1045, 2017.

LI, Y. et al. Identificação da melleína como substância patogênica de *Botryosphaeria dothidea* por análise UPLC-MS/MS e bioensaio fitotóxico. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 30, p. 8471-8481, 2021.

LYU, X. et al. The *Sclerotinia sclerotiorum* effector SsCP1 targets a host peroxidase to facilitate invasion. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 1030-1049, 2016.

LODHA, S.; MAWAR, R. Population dynamics of *Macrophomina phaseolina* in relation to disease management: A review. **Journal of Phytopathology**, v. 168, p. 1-17, 2020.

LUNA, A. B. et al. **Inhibición del crecimiento de Colletotrichum gloeosporioides mediante 09 antibióticos lipopeptídicos producidos por Bacillus sp. 83**. Cuernavaca: Instituto de Biotecnología, UNAM, 2015.

MACHADO, A. R. et al. Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 153, p. 89-100, 2019.

MAHATO, S. B. et al. Structure and Stereochemistry of Phaseolinic Acid: A New Acid from *Macrophomina Phaseolina*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 2, p. 245–47, 1987.

MAT RAZALI, N. et al. Genômica Comparativa: Insights sobre a Patogenicidade e Estilo de Vida de *Rhizoctonia solani*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 2183, 2021.

MELO, A. S. de et al. Management of white mold of soybean: use of fungicides and *Trichoderma* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 40, n. 6, p. 2905-2918, 2019.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de fitopatologia**. Recife: UFRPE, 2001.

MICHEREFF, S. J. et al. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J. et al. (ed.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Imprensa Universitária da UFRPE, 2005. p. 1-18.

MONTEIRO, M. C. P. et al. Antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 2, p. 381-389, 2017.

MOREIRA, G. J. B. et al. Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis* in vitro. **Biota Amazônia**, v. 7, n. 3, p. 45-51, 2017.

MOSQUERA, S.; GONZÁLEZ-JARAMILLO, L. M.; ORDÚZ, S.; VILLEGAS-ESCOBAR, V. Multiple response optimization of Bacillus subtilis EA-CB0015 culture and identification of antifungal metabolites. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, 2014. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.09.004.

MURAKAMI, L. Y. et al. Mineralização e Sorção do Fungicida Fluopicolida de Amostras de Solos Neossolo e Latossolo em áreas Preservadas e áreas Tratadas. **Revista Pesticidas – Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 24, p. 33-42, 2014.

MYO, E. M. et al. Characterization and antifungal activity of a *Bacillus velezensis* strain isolated from the rhizosphere of soybean. **Mycologia**, v. 113, n. 6, p. 1151-1166, 2021.

NAGAO, T. et al. Novas macrolactinas como lactonas antibióticas de uma bactéria marinha. **The Journal of Antibiotics**, v. 54, n. 4, p. 333–339, 2001.

NAGARAJ, B. et al. Estudos de gama de hospedeiros do fungo *Rhizoctonia solani* (Kuhn). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, p. 3856–3864, 2017.

OLIVEIRA, A. S. et al. *Bacillus* spp. como biofábricas de metabólitos secundários antifúngicos: Inovação além das formulações de organismos inteiros.

OLIVEIRA JÚNIOR, A. G. *et al*. **Composição biofungicida compreendendo *Bacillus velezensis***. Depositante: Universidade Estadual de Londrina. BR 102020013481-7. Depósito: 30 jun. 2020.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 544, out. 2014.

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

ONGENA, M. et al. Surfactina e lipopeptídeos fengicina de *Bacillus subtilis* como elicitores de resistência sistêmica induzida em plantas. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 1084–1090, 2007.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais. **World Population Prospects 2024**: Summary of Results. Nova York: ONU, 2024. Disponível em: https://population.un.org/wpp/publications/. Acesso em: 5 mar. 2026.

ORTIZ, A.; SANSINENEA, E. Antibióticos macrolactínicos: produtos naturais surpreendentes. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 584–600, 2020.
PAYNE, D. E.; BOLES, B. R. Interações emergentes entre componentes da matriz durante o desenvolvimento do biofilme. **Current Genetics**, v. 62, p. 137–141, 2016.

PELCHOVICH, G. et al. Menaquinone and iron are essential for complex colony development in *Bacillus subtilis*. **PLoS ONE**, v. 8, e79488, 2013.

Per TS, Khan MIR, Anjum NA, Masood A, Hussain SJ, Khan NA (2018) Jasmonatos em plantas sob estresse abiótico: a interação com outros fitormônios é importante. Environ Exp Bot 145:104–120

PERTOT, I. et al. Advantages and limitations involved in the use of microbial biofungicides for the control of root and foliar phytopathogens of fruit crops. **Italus Hortus**, v. 23, p. 3–12, 2016.

POVEDA, J.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F. *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 23, p. 8629-8645, 2021. DOI: 10.1007/s00253-021-11492-8.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and taxonomy. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, n. 8, p. 875-880, 1979.

QIU, C. S. et al. Production of isoquercitrin from quercetin by biotransformation using *Bacillus* sp. CSQ10 isolated from *Camellia sinensis* cultivation soils. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 46, n. 4, p. 545-555, 2023.

RAAIJMAKERS, J. M. *et al.* Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, [*s. l.*], v. 34, n. 6, p. 1037-1062, 2010.z

RABBEE, T. P.; SEREPA-DLAMINI, V. G.; CHOI, K. S. *Bacillus methylotrophicus*: a potent biocontrol agent against plant pathogens. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [*s. l.*], v. 29, n. 10, p. 1548-1558, 2019.

RAMOS-SANTOS, C. et al. Mecanismos moleculares associados à degradação da xilana por patógenos de plantas *Xanthomonas*. **Estrutura e dobramento de proteínas**, v. 289, n. 46, p. 32186-32200, 2014.

RÊGO-MACHADO, C. M. et al. **Cossupressão à tecnologia de RNAi**: histórico, mecanismo e exemplos de aplicação tópica de RNA para controle de fitopatógenos. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2021.

RELATÓRIO DE ECONOMIA AGRÍCOLA DA UNIVERSIDADE PURDUE PAER 2025-08. **Resultados da Pesquisa de Valores de Terras Agrícolas e Rendas em Dinheiro da Purdue**, ago. 2025.

SALAZAR, B. et al. *Bacillus* spp. as Bio-factories for Antifungal Secondary Metabolites: Innovation Beyond Whole Organism Formulations. **Microbial Ecology**, v. 86, n. 1, p. 1-24, 2022. DOI: 10.1007/s00248-022-02044-2.

SALAZAR, F.; ORTIZ, A.; SANSINENEA, E. Uma forte atividade antifúngica de 7-O-Succinil Macrolactina A vs Macrolactina A de *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149. **Current Microbiology**, v. 77, p. 3409–3413, 2020.

SALES JÚNIOR, R. et al. Pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in cowpea. **Revista Caatinga**, v. 33, p. 395-401, 2020.

SALVATORE, M. M. et al. Metabólitos Secundários Produzidos por *Macrophomina phaseolina* Isolada de *Eucalyptus globulus*. **Agricultura**, v. 10, n. 3, p. 72, 2020.

SARKAR, T. S. et al. Produção de óxido nítrico pelo patógeno necrotrófico *Macrophomina phaseolina* e a planta hospedeira na podridão do carvão da juta. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1-17, 2014.

SAVOY, V. L. T. Classificação dos Agrotóxicos. **O Biológico**, v. 73, n. 1, p. 91-92, 2011.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 5, p. 158-164, 1996.

SCHMID, R. et al. Análise integrativa de dados de espectrometria de massa multimodal em MZmine 3. **Nature Biotechnology**, v. 41, p. 447–449, 2023.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Surfactin biosynthesis: Molecular mechanisms and applications. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 9-10, p. 1168-1180, 2008.
SHORT, G. E.; WYLLIE, T. D.; AMMON, V. D. Quantitative Enumeration of *Macrophomina Phaseolina* in Soybean Tissues. **Phytopathology**, v. 68, n. 5, p. 736–41, 1978.

SHALIGRAM, N. S.; SINGHAL, R. S. Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications. Food Technology and Biotechnology, v. 48, n. 2, p. 119-134, 2010.

SHANG, Q. et al. The necrotrophic lifestyle of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. e13423, 2024. DOI: https://doi.org/10.1111/mpp.13423.

SILVA, C. C. G. et al. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 594, 2018.

SILVA, J. R.; SANTOS, M. A. Inibição do crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* por metabólitos obtidos via precipitação ácida. **Revista Brasileira de Fitopatologia**, v. 15, n. 2, p. 45-52, 2024.

SINHA, N. et al. A análise do secretoma de *Macrophomina phaseolina* identifica uma série de supostos fatores de virulência responsáveis pela doença da podridão do carvão nas plantas. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 623, 2022.

SINHA, N. et al. A análise do secretoma identificou superóxido dismutase extracelular e catalase de *Macrophomina phaseolina*. **Arquivos de Microbiologia**, v. 204, n. 1, p. 1-11, 2021.

SOKOLOVA, S. et al. Comparative study on the antimicrobial activity of propolis, catechin, quercetin and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 146, p. 110-116, 2014.

STEFANELLO, L. et al. Manejo da podridão radicular da mandioca pela combinação de manejo de solo, variedade resistente e controle biológico com *Trichoderma harzianum*. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 13, n. 1, p. 31-45, 2017.

TEIXEIRA, G. M. et al. Genomic insights into the antifungal activity and plant-growth promoting in *Bacillus velezensis* CMRP 4490. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 3495, 2020.

TORRES, M. J. et al. Production of lipopeptides and surfactant by *Bacillus subtilis* SE-1 and their inhibitory effects on various phytopathogenic fungi. **Microbiological Research**, v. 182, p. 31-39, jan. 2016.

TRIGOS, A. et al. Macrophominol a Diketopiperazine from Cultures of *Macrophomina Phaseolina*. **Pergamon**, v. 40, n. 6, p. 1697–98, 1995.

UMETSU, N.; SHIRAI, Y. Development of Novel Pesticides in the 21st Century. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2020.

USDA. ERS. **Estatísticas de renda e riqueza agrícola**: custos e retornos de commodities. Washington, DC: USDA, 2024.

USDA. FAS. **Soja**: Dados de Produção. 2025. Disponível em: https://www.fas.usda.gov/data/production/commodity/2222000.

VERWAAIJEN, B. et al. O transcriptoma de *Rhizoctonia solani* AG1-IB durante a interação com a planta hospedeira alface (*Lactuca sativa* L.). **PLoS ONE**, v. 12, e0177278, 2017.

WANG, M. et al. Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS): a platform for sharing and community curation of mass spectrometry data. Nature Biotechnology, 2016.

WEI, Y. H. et al. Identificação da acidificação induzida em culturas de *Bacillus subtilis* enriquecidas com ferro durante a fermentação de biossurfactante. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 174–178, 2003.

WONG, K. C. et al. In vitro and in silico antifungal activity of swietenocoumarin H and its derivatives against plant pathogenic fungi. **AMB Express**, v. 12, n. 1, p. 66, jun. 2022. DOI: 10.1186/s13568-022-01406-w.

WRATHER, J. A. et al. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. **Plant Disease**, v. 81, n. 1, p. 107-110, 1997.

WRATHER, J. A.; KENDIG, S. R.; TYLER, D. D. Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* population density and soybean yield. **Plant Disease**, v. 82, n. 2, p. 247-250, 1998.

XIAO, X. et al. Two novel *Sclerotinia sclerotiorum* effectors, Ss-RiH1 and Ss-SSVP1, are required for virulence. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 538-550, 2014.

YANG, J. et al. Genome mining, heterologous expression, antibacterial and antioxidant activities of lipoamides and amicoumacins from compost-associated *Bacillus subtilis* fmb60. **Molecules**, v. 26, n. 7, p. 1892, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3390/molecules26071892. Acesso em: 8 mar. 2026.

YE, M. et al. *Bacillus velezensis*: A precious species in biocontrol of plant diseases of agriculture. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 1-11, 2017.

ZHAN, J.; MCDONALD, B. A. Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 131-153, 2013.

7 APÊNDICES

APÊNDICE A – Dados Brutos da Avaliação Estatística da Precipitação Ácida.

Ajuste de pH	área do halo de inibição	Média
pH2	45,567	44,958
pH2	25,972	
pH2	38,673	
pH2	40,003	
pH2	72,732	
pH2	41,386	
pH2	48,153	
pH2	47,176	
pH4	45,675	51,791
pH4	43,229	
pH4	53,592	
pH4	44,207	
pH4	45,675	
pH4	42,776	
pH4	93,498	
pH4	45,675	

APÊNDICE B – Dados brutos do teste de Índice de crescimento micelial com amostra F4 em 24 horas de incubação.

Concentração	Horizontal (mm)	Vertical (mm)	Média Repetição (mm)	Média do Grupo (mm)	Área mm²	Média	Desvio Padrão amostral	Inibição (%)
365	0	0	0	0	0	0	0	100%
365	0	0	0	0	0	0	0	100%
365	0	0	0	0	0	0	0	100%
365	0	0	0	0	0	0	0	100%
182,5	0	0	0	0	0	0	0	100%
182,5	0	0	0	0	0	0	0	100%
182,5	0	0	0	0	0	0	0	100%
182,5	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,912	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,912	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,912	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,912	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,462	12,200	11,400	11,800	13,775	109,233	150,353	1,686465732	35,67%

0,462	13,200	12,700	12,950		131,664			
0,462	15,800	14,800	15,300		183,657			
0,462	13,900	16,200	15,050		176,856			
0,228	27,600	19,600	23,600		424,869			
0,228	13,000	17,800	15,400	19,2125	181,741	292,299	3,367089495	10,27%
0,228	18,500	19,000	18,750		276,067			
0,228	19,100	19,100	19,100		286,521			
Controle	22,700	21,000	21,850		374,399			
Controle	21,100	20,200	20,650	21,4125	334,752	360,821	1,239203373	0,00%
Controle	20,300	20,100	20,200		320,466			
Controle	23,000	22,900	22,950		413,669			

APÊNDICE C – Dados brutos do teste de Índice de crescimento micelial com amostra F4 em 48 horas de incubação

Concentração	Horizontal	Vertical	Média Repetição (mm)	Média do Grupo (mm)	Área mm²	Média	Desvio Padrão amostral	Inibição (%)
365	0	0	0		0	0	0	100%
365	0	0	0	0	0	0	0	100%
365	0	0	0		0	0	0	100%
365	0	0	0		0	0	0	100%
182,5	0	0	0		0	0	0	100%
182,5	0	0	0	0	0	0	0	100%
182,5	0	0	0		0	0	0	100%
182,5	0	0	0		0	0	0	100%
0,912	0	0	0		0	0	0	100%
0,912	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,912	0	0	0		0	0	0	100%
0,912	0	0	0		0	0	0	100%
0,462	39,0	32,2	35,6	36,488	986,302	1043,884	1,279	27,10%

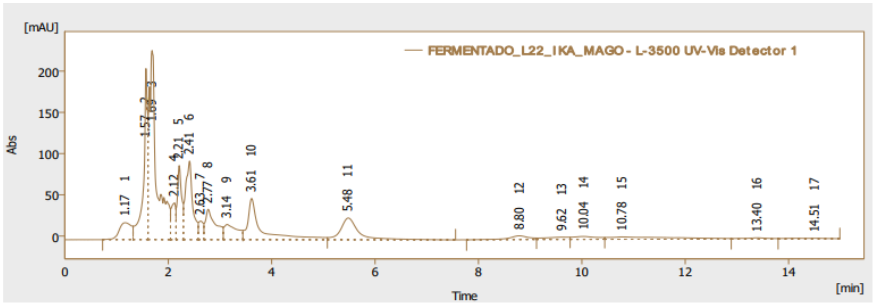
0,462	37,7	38,6	38,2		1142,926			
0,462	35,6	37,8	36,7		1056,894			
0,462	34,8	36,2	35,5		989,412			
0,228	26,1	28,4	41,5		582,168			
0,228	23,6	22,1	33,9	38,525	409,632	520,931	3,801	23,03%
0,228	25,4	24,2	36,9		482,768			
0,228	27,7	28,0	41,9		609,154			
Controle	51,3	49,4	50,4		1990,370			
Controle	49,8	49,4	49,6	50,050	1932,172	1967,193	0,407	0,00%
Controle	49,5	51,0	50,3		1982,736			
Controle	50,0	50,0	50,0		1963,494			

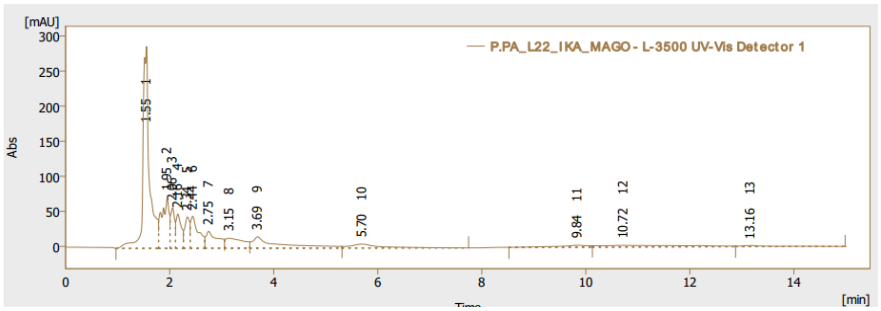
APÊNDICE D – Dados brutos do teste de Índice de crescimento micelial com amostra F4 em 72 horas de incubação

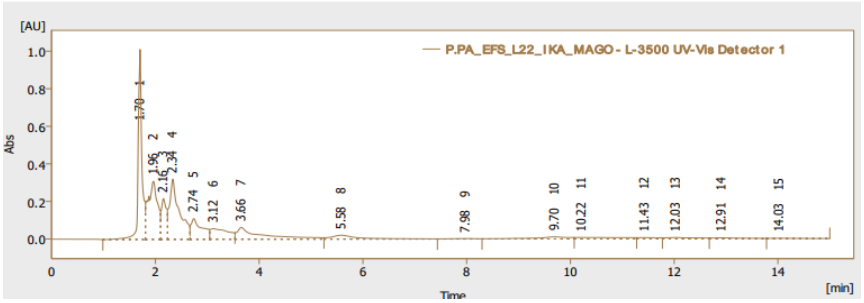
Concentração	Horizontal (mm)	Vertical (mm)	Média Repetição (mm)	Média do Grupo (mm)	Área mm²	Média	Desvio Padrão amostral	Inibição (%)
365	0	0	0		0			
365	0	0	0	0	0	0		100%
365	0	0	0		0			
365	0	0	0		0			
182,5	0	0	0		0			
182,5	0	0	0	0	0	0		100%
182,5	0	0	0		0			
182,5	0	0	0		0			
0,912	12,200	11,900	12,050		114,024			
0,912	10,900	12,100	11,500	11,725	103,586	107,865	0,253	79%
0,912	12,400	11,200	11,800		109,076			
0,912	11,500	11,600	11,550		104,772			

0,462	32,500	36,000	34,250	32,438	918,915	829,702	2,617	41%
0,462	31,000	31,000	31,000		754,767			
0,462	30,000	29,000	29,500		683,296			
0,462	34,400	35,600	35,000		961,829			
0,228	44,700	45,400	45,050	46,450	1593,870	1696,478	2,429	16%
0,228	48,800	49,500	49,150		1897,206			
0,228	45,000	50,500	47,750		1784,816			
0,228	44,300	43,400	43,850		1510,021			
Controle	55,000	55,000	55,000	55,000	2375,827	2375,827	0,000	0,00
Controle	55,000	55,000	55,000		2375,827			
Controle	55,000	55,000	55,000		2375,827			
Controle	55,000	55,000	55,000		2375,827			

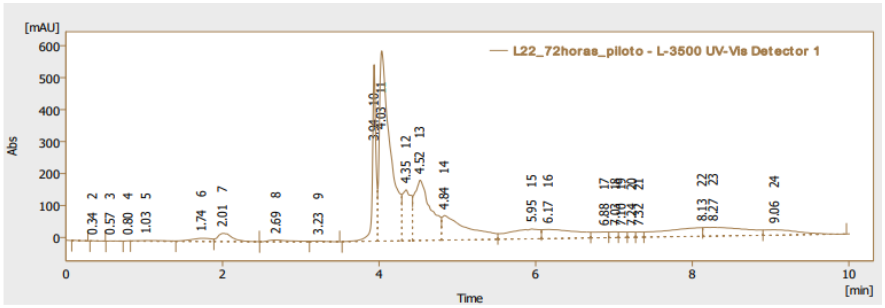
APÊNDICE E – Cromatogramas dos extratos da linhagem CMRP.

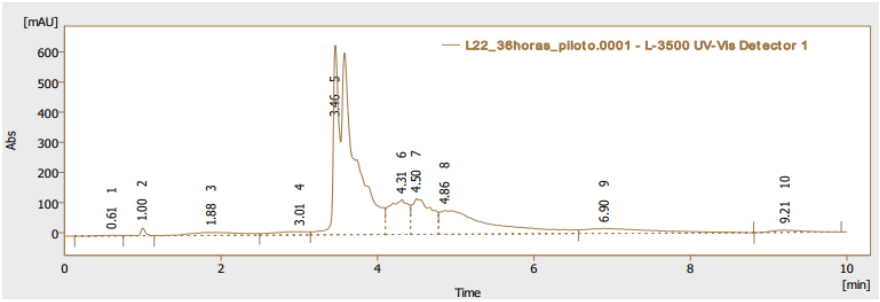


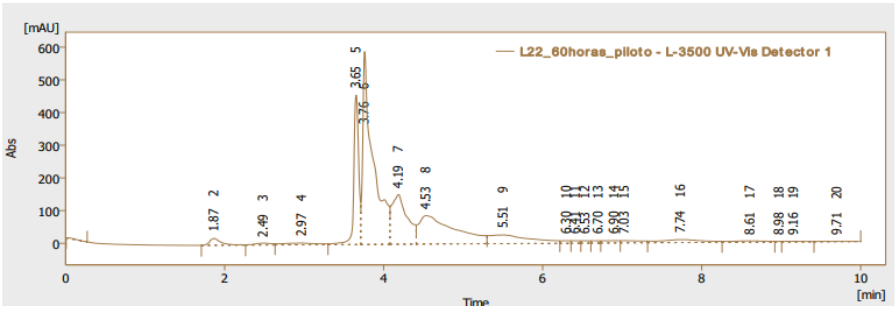




APÊNDICE F – Cromatogramas das amostras de curva de crescimento.







APÊNDICE G – Arquivos das corridas cromatográficas.

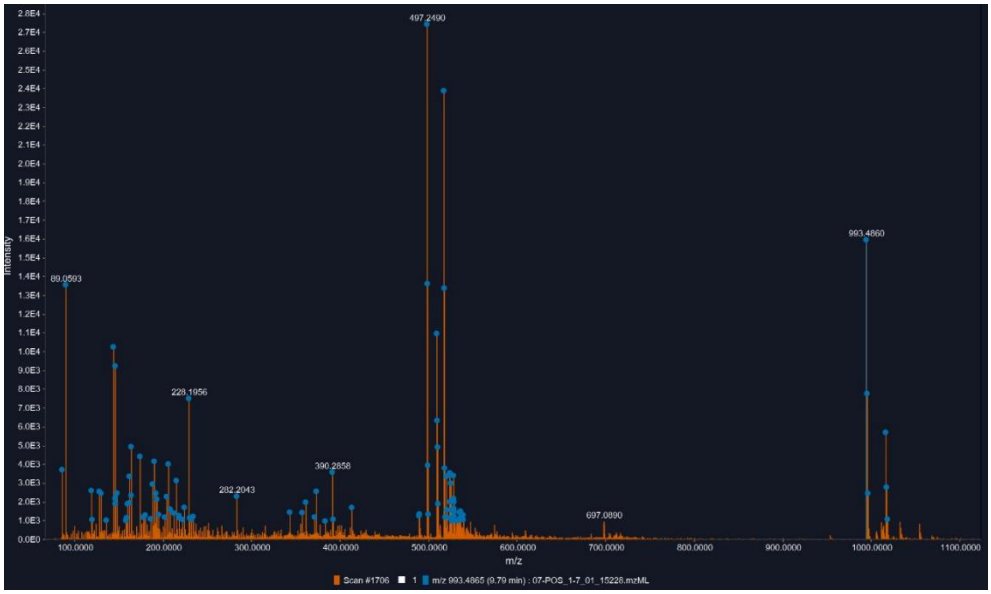
https://d.docs.live.net/b3544e6d5bc2969a/Área%20de%20Trabalho/Cromatogramas%20em%20CDF

APÊNDICE H – Rendimentos

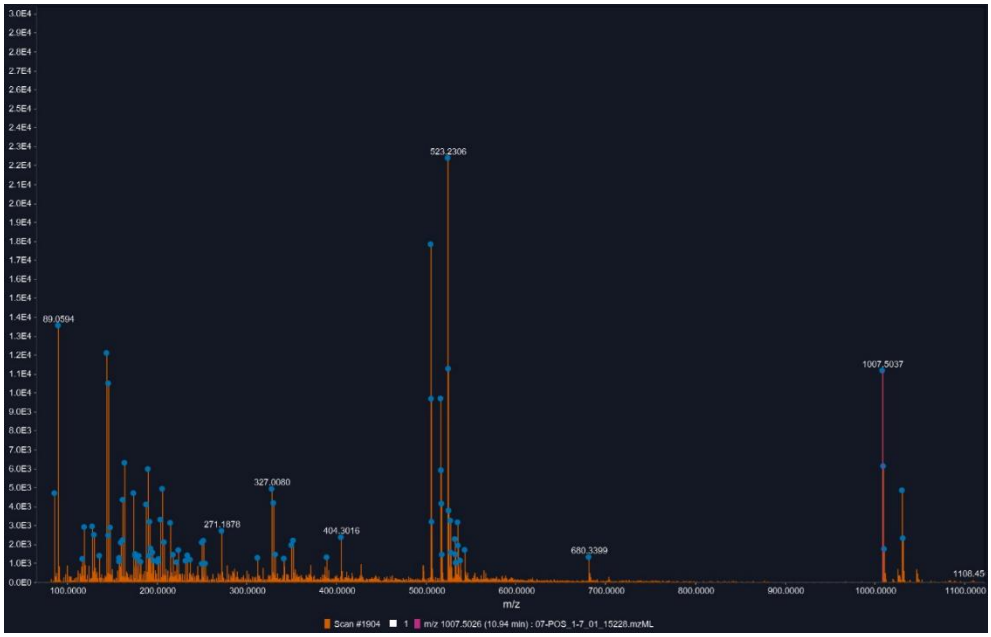
Amostra	Repetições	Massa inicial	Rendimento
C18 - EFS	4 cartuchos	60mg	27,667
C18 - EFS	3 cartuchos	75mg	12,6667
C18 - EFS	2 cartuchos	50mg	9,3333
F1.F4			4,6667
F2.F4			1
F3.F4			4
F4.F4			2,33
F5.F4			6
F6.F4			3
F7.F4			6
F8.F4			1
F9.F4			4,333
F10.F4			2
F11.F4			2
F1	11 corridas	2,75g	12
F2	11 corridas	2,75g	36
F3	11 corridas	2,75g	44,66664
F4	11 corridas	2,75g	87,3333

APÊNDICE I – Espectros de massa de correspondência de metabólitos.

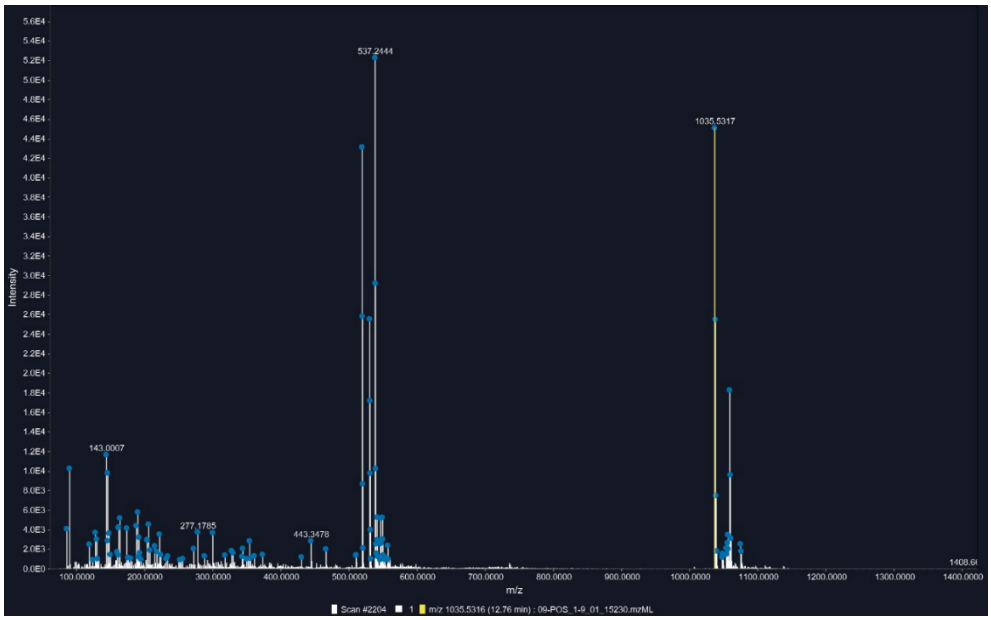
Espectro do pico com massa carga 993.4868.



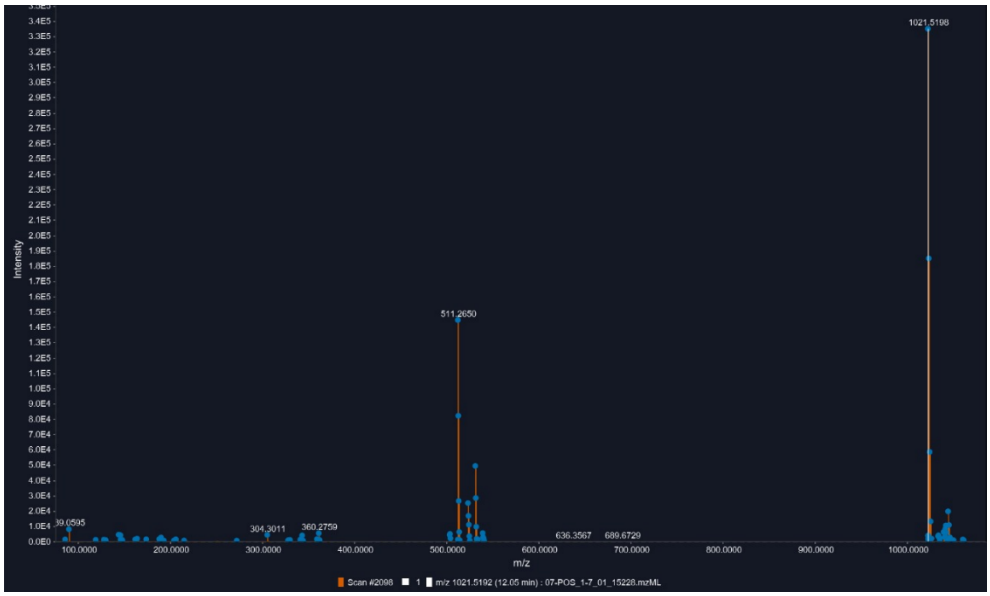
Espectro do pico com massa carga 1007.5030.



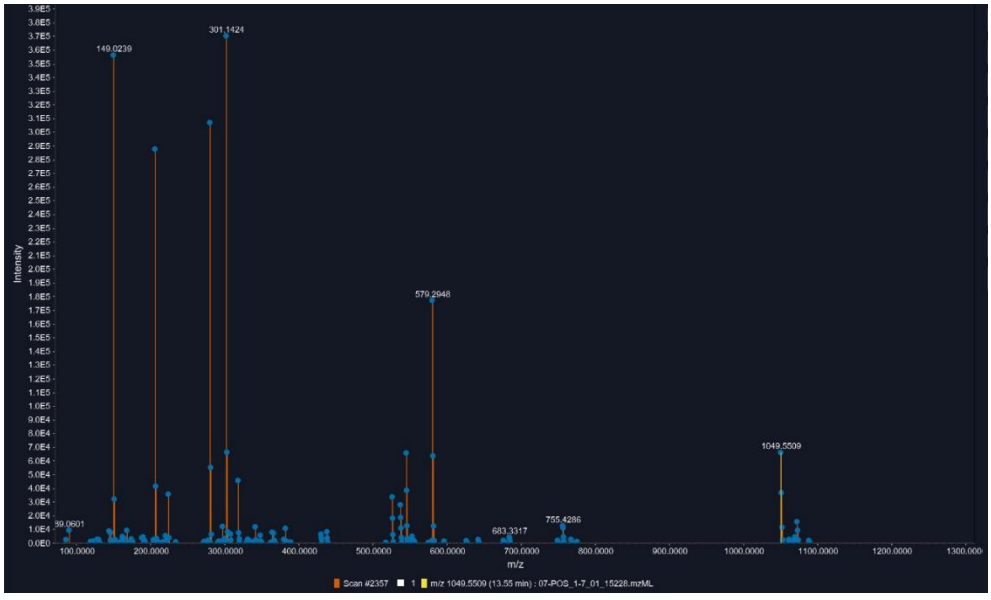
Espectro do pico com massa carga 1035.5291.



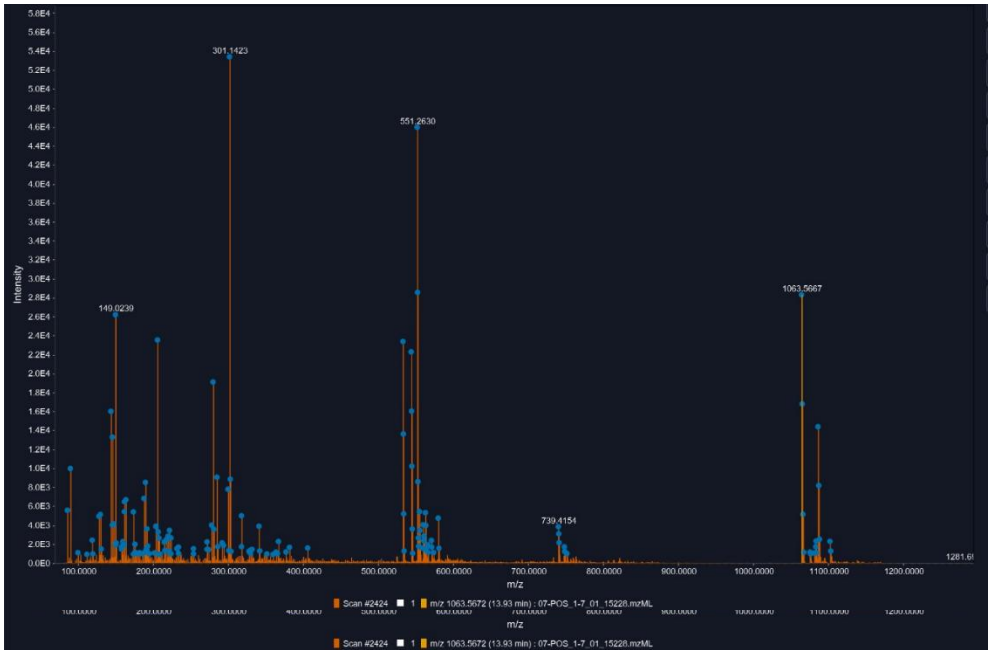
Espectro do pico com massa carga 1021.5198.



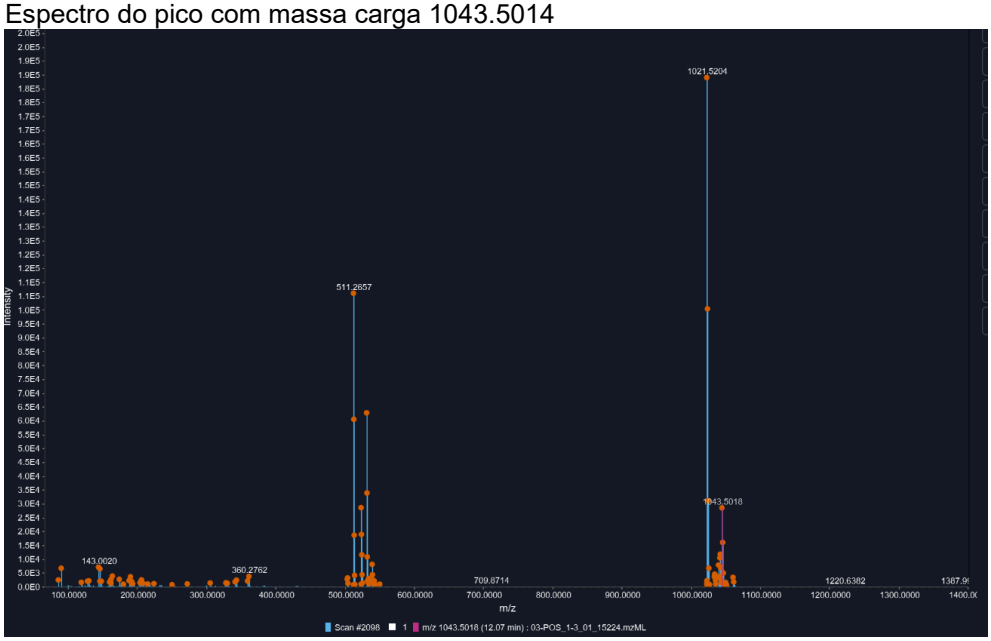
Espectro do pico com massa carga 1049.5496



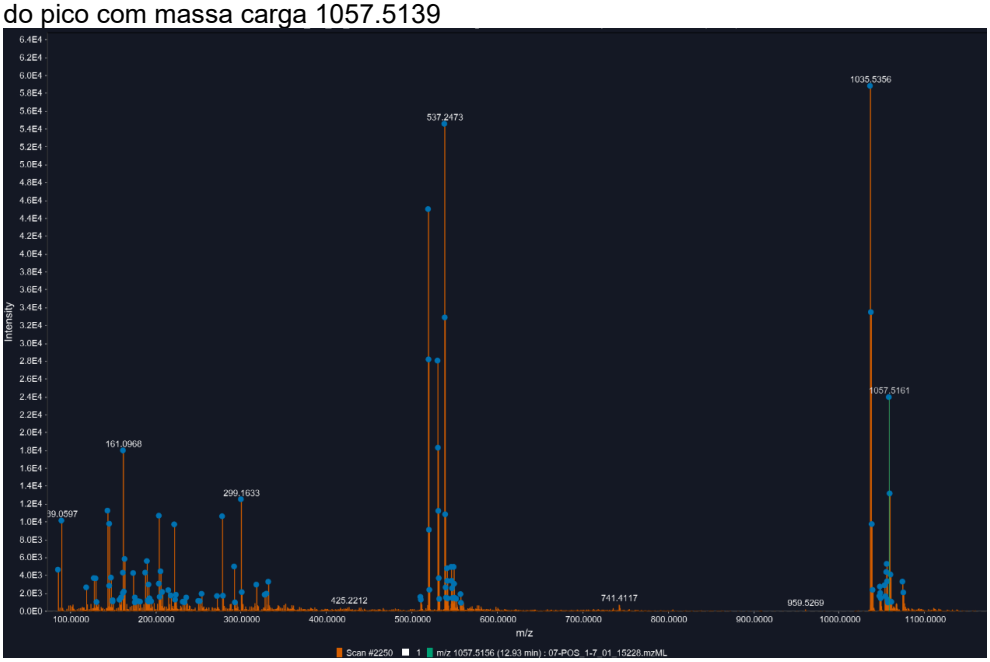
Espectro do pico com massa carga 1063.5649



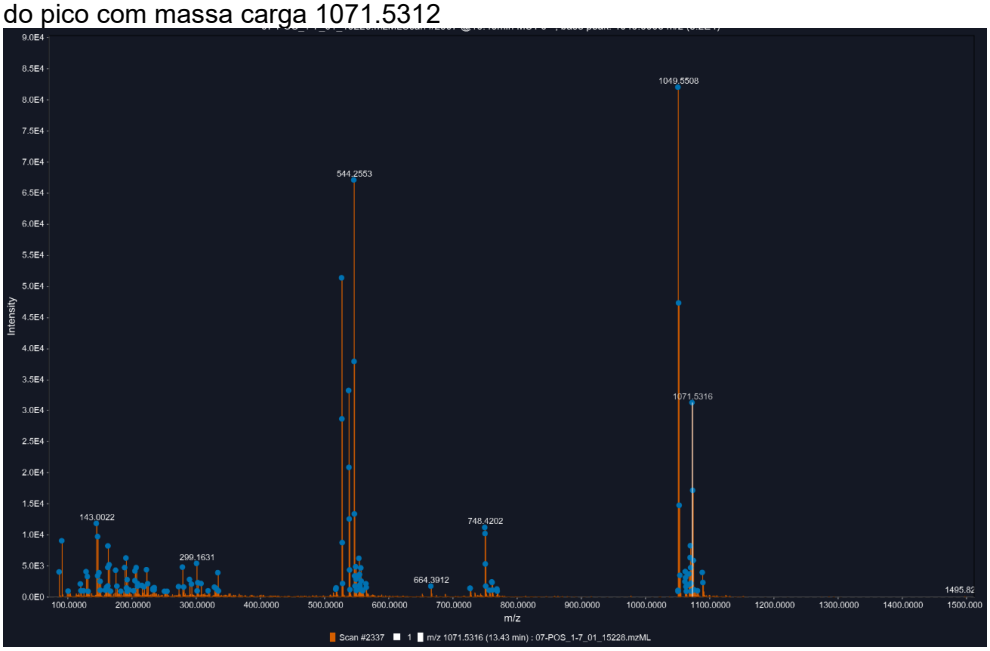
Espectro do pico com massa carga 1043.5014



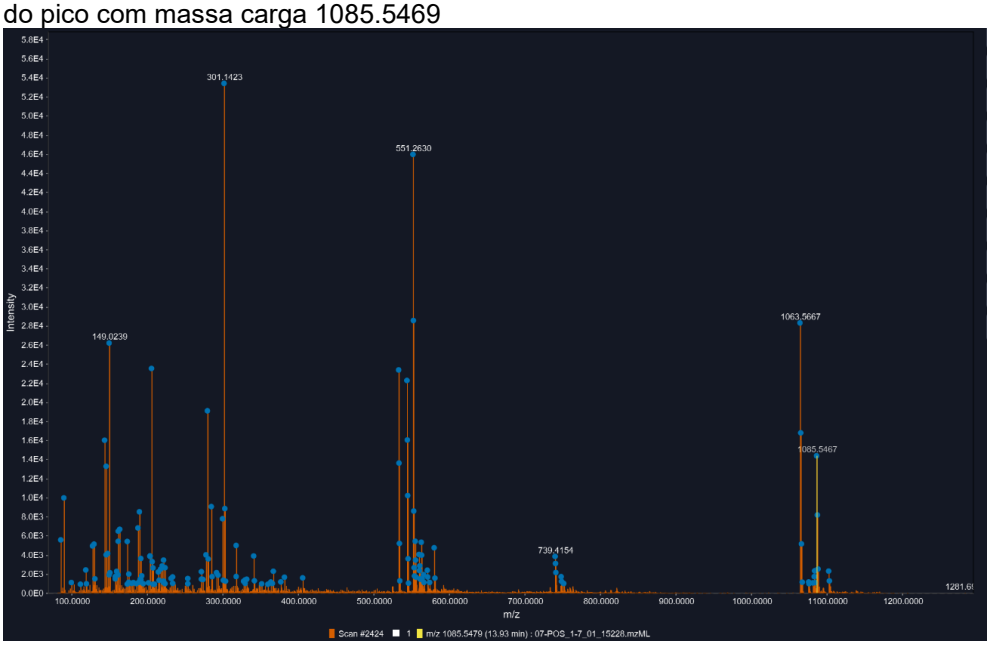
Espectro do pico com massa carga 1057.5139



Espectro do pico com massa carga 1071.5312



Espectro do pico com massa carga 1085.5469



MATERIAL COMPLEMENTAR

Link de acesso a análise estatística de dose-resposta da amostra F4:
https://d.docs.live.net/b3544e6d5bc2969a/Área%20de%20Trabalho/MIC%20F4.prism

Link de acesso a planilha de dados para precipitação ácida
https://d.docs.live.net/b3544e6d5bc2969a/Área%20de%20Trabalho/Mestrado/Estatistica/ESTATISTICA%20COM%20ÁREA.xlsx

Link para acesso as corridas em hplc analítico das frações purificadas
https://d.docs.live.net/b3544e6d5bc2969a/Área%20de%20Trabalho/corridas%20em%20jpeg