

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“ESTUDO DA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA A *PODOCARPUS*
MACROPHYLLUS: INTERAÇÕES NA MICROBIOTA, COMPOSTOS FIXOS E
VOLÁTEIS, E DO POTENCIAL DE APLICAÇÃO NA BIOTECNOLOGIA.”**

Thieres Magaive Costa Pereira

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR(A) EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ORGÂNICA

Orientador(a): Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

**São Carlos - SP
2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Thieres Magaive Costa Pereira, realizada em 05/06/2019:



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar



Prof. Dr. João Batista Fernandes
UFSCar



Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
UFSCar



Prof. Dr. João Oiano Neto
EMBRAPA



Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre
UNESP

Dedico a Deborah Araújo dos Santos, mesmo com todos os percalços dos nossa caminhos ela foi o estopim para essa jornada e ainda guardo memórias dos bons momentos juntos.

Agradecimentos

Agradeço a Deborah por não me deixar cair na inercia e iniciar essa jornada.

Aos meus amigos Guto, Emanuel, Rodrigo, Thalles e Paulinho por todo apoio e incentivo para prosseguir nessa jornada.

Ao professor Doutor Edson Rodrigues Filho pelo acolhimento no seu grupo de pesquisa e pela orientação.

A banca examinadora por aceitar prontamente o convite.

O professor Dr. Edenir Rodrigues e Lucimar Lopes Fialho, pelo auxílio nos experimentos de biorremediação de metais pesados.

Ao professor Dr. Geovane Lopes Sena e professor Dr. Eustáquio Ribeiro de Castro por disponibilizar a estrutura do Laboratório de polímeros e o Laboratório de instrumentação, do Núcleo de Competências em Química do Petróleo (NCQP) para a realização do experimento de biodegradação de polímeros.

A Karina Peronti Bicalho, Luiz Antônio Guimarães Ribas, Sósthene Delai e Vania Teles pelo acompanhamento psicológico e psiquiátrico ao longo de todos esses anos, todas as crises de depressão, ansiedade e ataques de pânico.

A todas pessoas que conheci e que me ajudaram enquanto estive desenvolvendo o trabalho no LaBioMMi, em especial para: Carol “roxa”, Daiane Mirante, Enzo e a Tatinha pela amizade e conversas produtivas e improdutivas.

Ao programa de Pós-graduação e a secretaria da pós-graduação.

A todos os demais que ajudaram de alguma forma no decorrer do desenvolvimento do trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – Código de Financiamento 001

“Do. Or do not. There is no try.”

(Yoda, Star Wars: The Empire Strikes Back, 1980)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
ABIPLAST	Associação Brasileira da Indústria do Plástico
ADONIS	Análise multivariada da variância
AHL	<i>N</i> -acil homoserina lactona
AMC	Metabólitos secundários com atividade antimicrobiana
ANA	Agência Nacional de Águas
ANOVA	Análise da variância
AS	Ácido sináptico
ATR FTIR	Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier e acessório de reflexão total atenuada
BDA	Ágar batata dextrose
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CCI	Índice correlação composto
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
CID	Dissociação Induzida por Colisão
CK	Citoquininas
DHB	Ácido 2,5-diidroxi-benzoico
DMS	Dimetil sulfeto
DMDS	Dimetil dissulfeto
DMTS	Dimetil trissulfeto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQ	Departamento de Química
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
EC	Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i>
FPP	Farnesilpirofosfato
GB	Gibberilinas

GC	Cromatografo a gás
GGPP	Geranilgeranilpirofosfato
GPP	Geranilpirofosfato
HCA	Análise de agrupamento hierárquicos
IAA	Auxinas (ácido indol-acético)
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Biodiversidade
IOFI	<i>International Organization of the Flavor Industry</i>
LaBioMMi	Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos
LAMP	Ensaio de amplificação em <i>looping</i>
LCFBM	<i>Liquid carbon-free basal médium</i>
<i>m/z</i>	Razão massa por carga
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MS	Espectrometria de Massas
MSP	<i>Main spectrum profiles</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCQP	Núcleo de Competências em Química do Petróleo
NMDS	<i>non-metric multidimensional scaling</i>
NRPS	Peptídeos não ribossomais
OTI	Organização Internacional do Trabalho
PA-11	Poliamida 11
PC	Componente principal
PCA	Análise componente principais
PCR	Proteína c-reativa (reação em cadeia da polimerase)
PEAD	Polietileno de alta densidade
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PET	Politereftalato de etileno
PGPB	Bactérias promotoras do crescimento de plantas
PGPMS	Microrganismos promotores do crescimento de plantas
PK	Policetídeos

PMF	Impressão digital de massa de peptídeo
PNUMA	Programa Ambiental das Nações Unidas
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PSD	<i>Post-source decay</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Peptídeos ribossomais
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T _c	Temperatura de cristalização
TFA	Ácido trifluoracético
T _g	Temperatura de transição vítrea
T _m	Temperatura de fusão
TOF	<i>Time of flight</i>
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
VOC	Compostos orgânicos voláteis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Foto de exemplar da planta <i>Podocarpus macrophyllus</i> , com frutos e sementes.....	3
Figura 1.2 Ilustração da diversidade estrutural de compostos produzidos por indivíduos pertencentes ao gênero <i>Podocarpus</i>	4
Figura 1.3. Esquema de um espectrômetro de massas do tipo MALDI - TOF/TOF MS.	23
Figura 1.4. Condições climáticas, nas estações de inverno e primavera, e localidades de coleta de material do experimento de comparação das comunidades de bactérias cultiváveis.	31
Figura 1.5. Demonstração das placas de isolamento para caule de <i>Podocarpus macrophyllus</i> após desinfecção e após 7 dias de incubação.....	32
Figura 1.6. Relação de porcentagem de microrganismos isolados por estação do ano.	37
Figura 1.7. Dendograma de MSP dos espectros de bactérias endofíticas obtido em MALDI-TOF MS na região de 2000 a 20000 Da no modo positivo de aquisição de íons..	39
Figura 1.8. Comparação dos espectros dos isolados LaBioMMi 1131 e 1137.....	40
Figura 1.9. Análise de correlação entre os espectros de MALDI-TOF MS dos grupos G3 e G6 de isolados do <i>Podocarpus macrophyllus</i>	41
Figura 1.10. Análise de correlação entre os espectros de MALDI-TOF MS dos grupos G7 de isolados do <i>Podocarpus macrophyllus</i>	42
Figura 1.11. Análise de HCA dos <i>fingerprints</i> de MALDI-TOF MS dos microorganismos endofíticos isolados do <i>Podocarpus macrophyllus</i>	43
Figura 1.12. Análise de correlação entre os espectros de MALDI-TOF MS dos isolados LaBioMMi 1137 de <i>Podocarpus macrophyllus</i>	44
Figura 1.13. Análise de correlação entre os espectros de MALDI-TOF MS dos isolados LaBioMMi 1180 de <i>Podocarpus macrophyllus</i>	45
Figura 1.14. Relação de porcentagem de microrganismos isolados segundo a estação do ano e localidade que coleta.	47
Figura 1.15. Comparação dos índices de Simpson e Shannon para as diferentes localidades e estações do ano: (1) São Carlos - inverno, (2) Araraquara - Inverno, (3) São Carlos - Primavera e (4) Araraquara - Primavera.	49

Figura 1.16. Gráfico de NMDS do perfil da comunidade de bactérias cultiváveis dos indivíduos de <i>Podocarpus macrophyllus</i> nas estações inverno e primavera, das localidades de São Carlos e Araraquara. (Stress value: 0,07)	50
Figura 1.17. Dendograma comparativo dos MSPs de bactérias do gênero <i>Bacillus</i> , isoladas de diferentes plantas e depositadas na microteca do LaBioMMi.	57
Figura 1.18. Gráfico de CCI dos MSPs de bactérias do gênero <i>Bacillus</i> , isolados de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.	59
Figura 1.19. Gráfico de (a) <i>score</i> e (b) <i>loadings</i> dos MSPs de bactérias do gênero <i>Bacillus</i> , isoladas de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi	60
Figura 1.20. Comparação dos espectros de MALDI TOF-MS de bactérias do gênero <i>Bacillus</i> , isolados de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.	61
Figura 1.21. Dendograma comparativo dos MSPs de bactérias do gênero <i>Enterobacter</i> , isolados de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.	63
Figura 1.22. Gráfico de CCI dos MSPs de bactérias do gênero <i>Enterobacter</i> , isolados de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.	64
Figura 1.23. Gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> dos MSPs de bactérias do gênero <i>Enterobacter</i> , isoladas de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.	65
Figura 1.24. Comparação dos espectros de MALDI TOF-MS de bactérias do gênero <i>Enterobacter</i> , isolados de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.	66
Figura 2.1. Ilustração estrutural dos metabólitos Iturina, Surfactina e Fengicina.	72
Figura 2.2. Esquema do mecanismo de interação entre a microbiota endofítica presente na rizosfera e com a planta.....	78
Figura 2.3. Análise de correlação entre os espectros de MALDI-TOF MS na região de 700 a 3000 Da e 2000 a 20000 Da dos <i>Bacillus</i> spp. isolados de <i>Podocarpus macrophyllus</i>	92
Figura 2.4. Gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> para os espectros, na região de 700 a 3000 Da, dos <i>Bacillus</i> spp. isolados de <i>Podocarpus macrophyllus</i>	93

Figura 2.5. Espectros de MALDI-TOF MS, na região de 700 a 3000 Da, para <i>Bacillus</i> spp. isolados de <i>Podocarpus macrophyllus</i> : a) LaBioMMi 1137, b) LaBioMMi 1141 e c) LaBioMMi 1202.....	94
Figura 2.6. Ilustração da fragmentação CID do íon 1029 Da por MALDI-TOF MS/MS, para células intactas de <i>Bacillus</i> spp.	98
Figura 2.7. Ilustração da fragmentação CID do íon 1044 Da por MALDI-TOF MS/MS, para células intactas de <i>Bacillus</i> spp.	100
Figura 2.8. Ilustração da fragmentação CID do íon 1072 Da por MALDI-TOF MS/MS, para células intactas de <i>Bacillus</i> spp.	100
Figura 2.9. Ilustração da fragmentação CID do íon 1058 Da por MALDI-TOF MS/MS, oriundos das frações obtidas dos extratos das células dos isolados LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202.	102
Figura 2.10. Ilustração da fragmentação CID do íon 1354 Da por MALDI-TOF MS/MS, oriundo de frações obtidas a partir do fracionamento dos extratos das células dos isolados LaBioMMi1137.....	104
Figura 2.11. Esquema da fragmentação da Plantazolicina por CID.....	105
Figura 2.12. Esquema do sistema de ressonância dos anéis oxazóis e tiazóis.	106
Figura 2.13. Espectros de fragmentação por CID das Fengicinas isoladas a partir os extratos dos isolados LaBioMMi 1180 e 1202.	108
Figura 2.14. Comparação dos cromatogramas obtidos para os hidrodestilados dos meios de cultura do isolado LaBioMMi 1180, sendo a) meio (1), b) meio (2) e c) meio (3)..	110
Figura 2.15. Estruturas de compostos voláteis encontrados no perfil das cepas de LabioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202.	117
Figura 2.16. Ilustração dos compostos voláteis terpenóides produzidos pelo isolado LaBioMMi 1180.	119
Figura 2.17. Estruturas dos compostos terpenóides produzidos pelo isolado LaBioMMi 1202 quando cultivado no meio de cultura 1.	119
Figura 2.18. Estruturas dos compostos terpenóides produzidos pelo isolado LaBioMMi 1202 quando cultivado no meio de cultura 1.	120
Figura 2.19. Experimento de interação entre isolados LaBioMMi 1180 e nos fungos <i>Xylaria</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp. e <i>Cladosporium</i> sp.....	124
Figura 2.20. Alteração da área de crescimento do fungo, em meio BDA, quando em contato com o isolado LaBioMMi 1180.	125

Figura 2.21. Alteração da área de crescimento do fungo, em meio R2A, quando em contato com o isolado LaBioMMi 1180.	125
Figura 2.22. Perfil dos espectros de MALDI TOF/MS para os microextratos do experimento de interação entre o isolado LaBioMMi 1180 e <i>Xylaria sp.</i> isolada do <i>Podocarpus macrophyllus</i>	126
Figura 3.1. Regiões afetadas pelos rompimentos das barragens em a) Brumadinho e b) Mariana ^{151,152}	134
Figura 3.2. Produção mundial de resinas termoplásticas e de transformados plásticos (2016). Fonte: Perfil 2017 ABIPLAST153.	135
Figura 3.3. Curva de crescimento do LaBioMMi 1141 (<i>Bacillus sp.</i>) em meios de cultura contendo os metais pesados Fe ³⁺ e Cu ²⁺	150
Figura 3.4. Gráficos de pareto para os efeitos padronizados do planejamento de fatorial fracionado para bioissorção de a) Fe ³⁺ e b) Cu ²⁺	155
Figura 3.5. Médias ajustadas da influência dos efeitos sobre a bioissorção de a) Fe ³⁺ e b) Cu ²⁺	157
Figura 3.6. Médias ajustadas da influência das interações sobre a bioissorção de a) Fe ³⁺ e b) Cu ²⁺	158
Figura 3.7. Gráficos de pareto para os efeitos padronizados para bioissorção de a) Fe ³⁺ e b) Cu ²⁺ no planejamento fatorial do experimento de bioissorção conjunta.	163
Figura 3.8. Médias ajustadas da influência dos efeitos sobre a bioissorção de a) Fe ³⁺ e b) Cu ²⁺ no planejamento fatorial do experimento de bioissorção conjunta.	164
Figura 3.9. Gráfico de a) PCA e b) Loadings para os espectros de MALDI TOF-MS das células intactas do LaBioMMi 1141 (<i>Bacillus sp.</i>) no experimento de bioissorção de Fe ³⁺	165
Figura 3.10. Gráfico de a) PCA e b) Loadings para os espectros de MALDI TOF-MS das células intactas do LaBioMMi 1141 (<i>Bacillus sp.</i>) no experimento de bioissorção de Cu ²⁺	166
Figura 3.11. Esquema da complexação da Bacillibactina com íons Fe ³⁺ e transporte para o interior da célula.	167
Figura 3.12. Representação do complexo ferri-Bacillibactina.	168
Figura 3.13. Esquema da proposta de fragmentação na fonte (PSD) da Bacillibactin.	170

Figura 3.14. Espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, do LaBioMMi 1141 (<i>Bacillus</i> sp.) cultivado em a) 350 mg/mL de Fe ³⁺ e b) 175 mg/mL de Fe ³⁺	171
Figura 3.15. Espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, do LaBioMMi 1141 (<i>Bacillus</i> sp.) cultivado em a) 0.08 mg/mL de Cu ²⁺ e b) 0.04 mg/mL de Cu ²⁺	172
Figura 3.16. Formação do complexo siderofo-Fe(III) com o metabólito surfactina (C15) produzido pelo LaBioMMi 1180: a) 20 µmol/L de surfactina (C15) e b) 20 µmol/L de surfactina + excesso de 200 vezes de Fe ³⁺	173
Figura 3.17. Representação do complexo ferri-surfactina	174
Figura 3.18. Oscilação da média de massas dos polímeros durante o processo de biodegradação pelo LaBioMMi 1180 (<i>Bacillus subtilis</i>).	177
Figura 3.19. Mecanismo de biodegradação de cadeia polimérica adaptado a partir do descrito por Vasile et al. 1993.	180
Figura 3.20. Espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, para o extrato do cultivo do LaBioMMi 1180 (<i>Bacillus subtilis</i>) com PEAD como fonte de carbono.	183
Figura 3.21. Espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, para o	185
Figura 3.22. Espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, para o extrato do cultivo do LaBioMMi 1180 (<i>Bacillus subtilis</i>) com PS como fonte de carbono.	185
Figura 3.23. Espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, para o extrato do cultivo do LaBioMMi 1180 (<i>Bacillus subtilis</i>) com PA-11 como fonte de carbono.	186
Figura 3.24. Espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, para o extrato do cultivo do LaBioMMi 1180 (<i>Bacillus subtilis</i>) com PET como fonte de carbono.	187
Figura 3.25. Espectro de infravermelho das amostras de PEAD, controle e biodegradadas, do experimento com o isolado LaBioMMi 1180 (<i>Bacillus subtilis</i>).	188
Figura 3.26. Espectro de infravermelho das amostras de PP, controle e biodegradadas, do experimento com o isolado LaBioMMi 1180 (<i>Bacillus subtilis</i>).	189

Figura 3.27. Espectro de infravermelho das amostras de PS, controle e biodegradadas, do experimento com o isolado LaBioMMi 1180 (<i>Bacillus subtilis</i>).....	190
Figura 3.28. Espectro de infravermelho das amostras de PA-11, controle e biodegradadas, do experimento com o isolado LaBioMMi 1180 (<i>Bacillus subtilis</i>).....	191
Figura 3.29. Espectro de infravermelho das amostras de PET, controle e biodegradadas, do experimento com o isolado LaBioMMi 1180 (<i>Bacillus subtilis</i>).....	192

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Listagem de fungos endofíticos produtores de taxol isolados de diferentes plantas hospedeiras.	15
Tabela 1.2. Comparação entre as diferentes metodologias de identificação de microrganismos.	19
Tabela 1.3. Descrição dos parâmetros utilizados na aquisição de íons para o modo linear.	33
Tabela 1.4. Parâmetros utilizados no pré-processamento para identificação das bactérias, análise de componentes principais e matriz de índice de correlação.	34
Tabela 1.5. Parâmetros do procedimento de criação de MSP (<i>Main Spectra Projections</i>) e comparação com a biblioteca	34
Tabela 1.6. Parâmetros para as análises de componentes principais (PCA) e matriz de índice de correlação (CCI).	34
Tabela 1.7. Relação de quantidade de isolados por região da planta e estação do ano.	36
Tabela 1.8. Frequência de isolamento e desvio padrão para cada cepa, segundo e estação do ano.	46
Tabela 1.9. Valores do teste estatístico de Shapiro-Wilk para os isolados do experimento de comparação das comunidades de bactérias cultiváveis de São Carlos e Araraquara.	47
Tabela 1.10. Resultado do teste de Kruskal - Wallis relativo ao isolado LaBioMMi 1137 e da comunidade de bactérias cultiváveis total do experimento de comparação.	48
Tabela 1.11. Descrição das bactérias do gênero <i>Bacillus</i> , isolados de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.	55
Tabela 1.12. Descrição das bactérias do gênero <i>Enterobacter</i> , isoladas de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.	62

LISTA DE FIGURAS NO APENDICE

Figura apêndice 1. Gráfico de resíduos por ordem para o experimento de bioissorção de Fe ³⁺	223
Figura apêndice 2. Gráfico de resíduos ajustados para o experimento de bioissorção de Fe ³⁺	223
Figura apêndice 3. Gráfico de resíduos por ordem para o experimento de bioissorção de Cu ²⁺	224
Figura apêndice 4. Gráfico de resíduos ajustados para o experimento de bioissorção de Cu ²⁺	224
Figura apêndice 5. Análise dinâmico mecânica PEAD controle.....	225
Figura apêndice 6. Análise dinâmico mecânica PEAD 30 dias.....	225
Figura apêndice 7. Análise dinâmico mecânica PP controle.....	226
Figura apêndice 8. Análise dinâmico mecânica PP 30 dias.....	226
Figura apêndice 9. Análise dinâmico mecânica PP 60 dias.....	227
Figura apêndice 10. Análise dinâmico mecânica PS controle.....	227
Figura apêndice 11. Análise dinâmico mecânica PS 30 dias.....	228
Figura apêndice 12. Análise dinâmico mecânica PS 60 dias.....	228
Figura apêndice 13. Análise dinâmico mecânica PA-11 controle.	229
Figura apêndice 14. Análise dinâmico mecânica PA-11 30 dias.....	229
Figura apêndice 15. Análise dinâmico mecânica PA-11 60 dias.....	230
Figura apêndice 16. Análise dinâmico mecânica PET controle.	230
Figura apêndice 17. Análise dinâmico mecânica PET 30 dias.....	231
Figura apêndice 18. Análise dinâmico mecânica PA-11 60 dias.....	231
Figura apêndice 19. DSC PEAD controle.	232
Figura apêndice 20. DSC PEAD 30 dias.	233
Figura apêndice 21. DSC PEAD 60 dias.	234
Figura apêndice 22. DSC PP controle.....	235
Figura apêndice 23. DSC PP 30 dias.	236
Figura apêndice 24. DSC PP 60 dias.	237
Figura apêndice 25. DSC PA-11 controle.....	238
Figura apêndice 26. DSC PET controle.....	239
Figura apêndice 27. DSC PET 30 dias.....	240
Figura apêndice 28. DSC PET 60 dias.....	241

Figura apêndice 29. DSC PS 60 dias.	242
--	-----

LISTA DE TABELAS NO APÊNDICE

Tabela apêndice 1. Lista de microrganismos isolados de um indivíduo da espécie <i>Podocarpus macrophyllus</i> ao longo das estações inverno, primavera, verão e outono.	211
Tabela apêndice 2. Microrganismos isolados em Araraquara e São Carlos nas estações de inverno e primavera.	212
Tabela apêndice 3. Compostos voláteis do óleo essencial de <i>Podocarpus macrophyllus</i>	216
Tabela apêndice 4. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1137 (<i>Bacillus pumilus</i>) no meio M1.	217
Tabela apêndice 5. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1137 (<i>Bacillus pumilus</i>) no meio M2.	218
Tabela apêndice 6. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1137 (<i>Bacillus pumilus</i>) no meio M3.	218
Tabela apêndice 7. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1141 (<i>Bacillus licheniformis</i>) no meio M1.	219
Tabela apêndice 8. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1141 (<i>Bacillus licheniformis</i>) no meio M2.	219
Tabela apêndice 9. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1141 (<i>Bacillus licheniformis</i>) no meio M3.	220
Tabela apêndice 10. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1202 (<i>Bacillus subtilis</i>) no meio M1.	220
Tabela apêndice 11. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1202 (<i>Bacillus subtilis</i>) no meio M2.	221
Tabela apêndice 12. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1202 (<i>Bacillus subtilis</i>) no meio M3.	222

RESUMO

“ESTUDO DA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA A *PODOCARPUS MACROPHYLLUS*: INTERAÇÕES NA MICROBIOTA, COMPOSTOS FIXOS E VOLÁTEIS, E DO POTENCIAL DE APLICAÇÃO NA BIOTECNOLOGIA.”

A diversidade da comunidade bacteriana associada à planta *Podocarpus macrophyllus* foi estudada sistematicamente a fim de se determinar os gêneros de bactérias que comumente estão associadas a essa planta com maior frequência, bem como a composição da comunidade bacteriana se altera devido a condições regionais e sazonais. Constatou-se que gênero *Bacillus* é principal associado à planta hospedeira, sendo isolado em todas as regiões e estações do ano, e em todos os tecidos utilizados nos procedimentos de isolamento. Dentro desse gênero, a espécie *Bacillus pumilus* foi majoritariamente isolada em todas as condições de estudo. Adicionalmente, o potencial biotecnológico das principais bactérias associadas à planta foi avaliado através do estudo da produção de compostos fixos e voláteis, por essas bactérias, bem com a interação com fungos endofíticos associados a mesma planta. Essas bactérias são hábeis produtoras de lipopeptídeos, sendo que moléculas de surfactina, iturina foram identificadas e isoladas de todas as cepas, moléculas de fengicina foram isoladas das cepas LaBioMMi 1180 e 1202 que correspondem a espécie *Bacillus subtilis*, por fim a molécula de plantazolicina foi isolada a partir do LaBioMMi 1137 que corresponde ao *Bacillus pumilus*. Tais metabólitos são os principais responsáveis pela atividade inibitória dessas bactérias quando cultivadas com fungos endofíticos isolados da mesma planta. Com relação aos compostos voláteis, todas as cepas demonstraram grande habilidade para produção de compostos nitrogenados como pirazina e compostos oxigenados como cetonas de cadeia curta. Os *Bacillus* spp. demonstram grande potencial de aplicação biotecnológica em biorremediação e biodegradação de polímeros. Quando cultivado em meios enriquecidos com Fe^{3+} , o LaBioMMi 1141 demonstrou a capacidade de bioissorver grande parte do conteúdo de metal pesado dependendo da condição em que foi cultivado. Os resultados para bioissorção de Cu^{2+} e da composição de Fe^{3+} juntamente com Cu^{2+} , não foram semelhantes aos observados para o Fe^{3+} isoladamente. Em contrapartida, o LaBioMMi 1180 demonstrou ser capaz de biodegradar diversos polímeros, quando esses são a única fonte de carbono do meio.

Palavras-chave: *Podocarpus macrophyllus*, bactérias endofíticas, MALDI TOF/MS, surfactina, iturina, fengicina, plantazolicina, compostos voláteis, co-cultivo, biorremediação, biodegradação.

ABSTRACT

“A STUDY OF THE BACTERIAL COMMUNITY ASSOCIATED WITH *PODOCARPUS MACROPHYLLUS*: INTERACTIONS IN THE MICROBIOTA, FIXED AND VOLATILE COMPOUNDS, AND THE POTENTIAL FOR APPLICATION IN BIOTECHNOLOGICAL.”

The diversity of the bacterial community associated with the *Podocarpus Macrophyllus* plant has been systematically studied in order to determine the genera of bacteria that are commonly associated with this plant, as well as the composition of the community bacterial changes due to regional and seasonal conditions. It was included that genus *Bacillus* is the main associated with the host plant, being isolated in all regions and seasons, and in all tissues used in the procedures of isolation. Within this genus, the species *Bacillus pumilus* was largely isolated in all studied conditions. Additionally, the biotechnological potential of the main bacteria associated with the plant was evaluated by the studying the production of fixed and volatile compounds, as well as the interaction with endophytic fungi associated with the same plant. These bacteria are skillful producing lipopeptides, surfactin and iturin were identified and isolated from all strains, fengycins were isolated from LaBioMMi 1180 and 1202 strains that correspond to *Bacillus subtilis*. Finally, the plantazolicin was isolated from LaBioMMi 1137, which corresponds to *Bacillus pumilus*, and such metabolites are the main responsible for the inhibitory activity of these bacteria, when cultivated with endophytic fungi Isolated from the same plant. With regard to volatile compounds, all strains demonstrate great ability to produce nitrogenous compounds, such as pyrazine, and oxygenated compounds as short chain ketones. *Bacillus* spp. demonstrates great potential for biotechnological application for bioremmenation and biodegradation of polymers. When cultivated in medium enriched with Fe^{3+} , LaBioMMi 1141 demonstrated the ability to absorb much of the heavy metal content depending on the condition in which it was cultivated. The results for the biosorption of Cu^{2+} and the composition of Fe^{3+} together with Cu^{2+} showed no satisfactory results in comparison with Fe^{3+} alone. On the other hand, LaBioMMi 1180 has been shown to be able to degrade several polymers, when these are the unique carbon source in the medium, thus demonstrating the great potential of these endophytic microorganisms.

Keywords: *Podocarpus macrophyllus*, endophyte bacteria, MALDI TOF/MS, surfactin, iturin, fengicin, plantazolicin, volatile compounds, co-culturee, bioremediation, biodegradation.

Sumário

CAPÍTULO 1:	1
1 Introdução	2
1.1 <i>Podocarpus macrophyllus</i> e sua diversidade química.....	2
1.2 Microrganismos endofíticos	6
1.3 MALDI-TOF MS para a identificação de microrganismos.....	18
2 Objetivos	27
2.1 Objetivos Específicos	27
3 Métodos.....	28
3.1 Materiais e reagentes utilizados para o cultivo e isolamento de microrganismos.....	28
3.2 Equipamentos utilizados para o cultivo e isolamento de microrganismos	28
3.3 Equipamentos utilizados para a identificação dos microrganismos isolados	29
3.4 Softwares utilizados no processamento dos dados dos experimentos de indentificação de microrganismos endofíticos e avaliação da comunidade bacteriana associada a <i>Podocarpus macrophyllus</i>	29
3.5 Material vegetal	30
3.6 Metodologia de isolamento dos microrganismos endofíticos associados à <i>Podocarpus macrophyllus</i>	31
3.7 Metodologia de preparo das amostras para aquisição dos espectros de MALDI - TOF MS	32
3.8 Metodologia de aquisição de espectros MALDI-TOF MS.....	33
3.9 Processamento de dados de MALDI - TOF MS e MALDI - TOF/TOF MS	33
3.10 Análise estatística da comunidade de bactérias cultiváveis associada à <i>Podocarpus macophyllus</i>	35
4 Resultados e discussões	35
4.1 Isolamento e análise qualitativa da variação sazonal de bactérias endofíticas associadas à <i>Podocarpus macrophyllus</i>	35
4.2 Comparação sazonal e regional da comunidade de bactérias cultiváveis cultivável associada à <i>Podocarpus macrophyllus</i> utilizando fingerprint de MALDI-TOF MS.	42
4.3 Comparação entre <i>fingerprint</i> de MALDI TOF-MS de microrganismos endofíticos de diferentes plantas.....	55
5 Conclusões.....	67
CAPÍTULO 2:	70

1	Introdução	71
1.1	O gênero <i>Bacillus</i>	71
1.2	Metabólitos secundários Iturina, Surfactina e Fengicina.	71
1.3	Compostos voláteis produzidos por <i>Bacillus</i> spp.	73
1.4	O papel dos metabólitos secundários na interação entre microrganismos, e microrganismos e planta hospedeira.....	75
1.4.1	Interação entre bactérias e outros microrganismos.....	75
1.4.2	Interação entre bactérias e plantas	76
2	Objetivos	81
2.1	Objetivos específicos.....	81
3	Métodos.....	82
3.1	Materiais e reagentes utilizados no o cultivo dos microrganismos	82
3.2	Equipamentos utilizados para o cultivo e isolamento de microrganismos	83
3.3	Equipamentos utilizados para a isolamento dos compostos e identificação dos produzidos pelos isolados LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202	83
3.4	<i>Softwares</i> utilizados no processamento dos dados dos experimentos de indentificação de microrganismos endofíticos e avaliação da comunidade bacteriana associada à <i>Podocarpus macrophyllus</i>	84
3.5	Avaliação do perfil de compostos fixos produzidos por <i>Bacillus</i> spp.	85
3.5.1	Metodologia de preparo das amostras para aquisição dos espectros de MALDI - TOF MS	85
3.5.2	Metodologia de aquisição de espectros MALDI-TOF MS.....	85
3.5.3	Processamento dos dados de MALDI - TOF MS e MALDI - TOF/TOF MS	86
3.5.4	Experimento de cultivo em escala ampliada	87
3.5.5	Fracionamento dos extratos bacterianos	88
3.6	Avaliação do perfil de compostos voláteis produzidos por <i>Bacillus</i> spp. .	89
3.6.1	Procedimento de cultivo das bactérias e processo de hidrodestilação ..	89
3.6.2	Procedimento de análise dos compostos voláteis por CG-MS	90
3.7	Experimento de interação de crescimento do isolado LabioMMi 1180 e fungos endofíticos de <i>Podocarpus macrophyllus</i>	90
3.7.1	Procedimento de co-cultivo do isolado LaBioMMi 1180 e fungos endofíticos de <i>Podocarpus macrophyllus</i>	90
4	Resultados e discussões	91
4.1	Avaliação do perfil de compostos fixos produzidos pelas cepas LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202 de <i>Bacillus</i> spp.....	91

4.2	Avaliação dos perfil de compostos voláteis produzidos pelas cepas LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202 de <i>Bacillus</i> spp.	109
4.3	Experimento de interação de crescimento entre o isolado LabioMMi 1180 e fungos endofíticos de <i>Podocarpus macrophyllus</i>	123
5	Conclusões.....	128
CAPÍTULO 3:		130
1	Introdução	131
1.1	Crimes ambientais e poluição ambiental através da contaminação por despejo de rejeitos de mineração	131
1.2	Poluição ambiental por despejo de materiais poliméricos	134
1.3	Microrganismos e a promessa para mitigação de ambientes poluídos ..	137
2	Objetivos	139
2.1	Objetivos específicos.....	139
3	Métodos.....	139
3.1	Materiais e reagentes utilizados para o cultivo e dos microrganismos nos experimentos de Biossorção e Biodegradação	139
3.2	Equipamentos utilizados para o cultivo nos experimentos de Biossorção e Biodegradação.....	141
3.3	Equipamentos utilizados nos experimentos de Biossorção e Biodegradação.....	141
3.4	Softwares utilizados no processamento dos dados dos experimentos de Biossorção e Biodegradação	142
3.5	Experimento de biossorção de metais pesados:.....	142
3.5.1	Preparação dos meios de cultura.....	142
3.5.2	Estimativa da curva de crescimento do isolado LaBioMMi 1141 (<i>Bacillus</i> sp.) em meios de cultura enriquecidos com Fe ³⁺ e Cu ²⁺	143
3.5.3	Elaboração do planejamento fatorial fracionado	143
3.5.4	Determinação da concentração de metais no meio de cultura	144
3.6	Metodologia de aquisição dos espectros de MALDI-TOF MS	144
3.7	Processamento dos dados de MALDI - TOF/TOF MS	145
3.8	Experimento de biodegradação de materiais poliméricos	146
3.8.1	Preparação das amostras poliméricas para o ensaio de biodegradação	146
3.8.2	Determinação gravimétrica da perda de massa e obtenção do extrato do caldo de cultura do meio LCFBM.....	146
3.8.3	Obtenção do espectro de FTIR para as amostras poliméricas.....	147
3.8.4	Determinação da temperatura de transição vítrea para as amostras poliméricas	147

3.8.5	Determinação das temperaturas de fusão e cristalização, entalpias de fusão e cristalização para as amostras poliméricas	148
3.9	Análise estatística.....	148
4	Resultados e discussões	149
4.1	Experimento de bioissorção de metais pesados pelo <i>Bacillus</i> sp. (LaBioMMi 1141)	149
4.1.1	Determinação das condições experimentais do planejamento fatorial do experimento de bioissorção de metais pesados.	149
4.1.2	Análise do planejamento fatorial do experimento de bioissorção de metais pesados.....	150
4.1.3	Análise dos espectros de MALDI TOF-MS das células intactas do LaBioMMi 1141 (<i>Bacillus</i> sp.) submetido aos experimentos de bioissorção de Fe ⁺ e Cu ²⁺	164
4.2	Experimento de biodegradação de polímeros utilizando o isolado LaBioMMi 1180 (<i>Bacillus subtilis</i>).....	175
4.2.1	Análise gravimétrica dos resíduos biodegradados	175
4.2.2	Análise dos extratos do meio de cultura do experimento de biodegradação por MALDI TOF/TOF MS	178
4.2.3	Caracterização das amostras controle de biodegradadas dos polímeros utilizados nos experimentos de biodegradação.	187
5	Conclusões.....	195
6	Referências	197
7	Apêndices.....	211

CAPÍTULO 1:

Aplicação de MALDI-TOF MS e ferramentas de análise multivariada na identificação e perfilagem metabólica de microrganismos endofíticos associados à *Podocarpus macrophyllus*

1 Introdução

1.1 *Podocarpus macrophyllus* e sua diversidade química

A família *Podocarpaceae*, pertencente à ordem *Pinales*, destaca-se primeiramente pela adaptabilidade e consequente colonização dos mais diversos nichos ecológicos por espécies pertencentes a essa família. Estima-se que esta família teve origem na Gondwana e posteriormente difundiu-se para o norte, para regiões atualmente pertencentes ao Caribe, à Etiópia e Ásia oriental. Atualmente, Malásia e Austrália possuem a maior diversidade de gêneros da família *Podocarpaceae* e nessas regiões são encontrados 17 dos 19 gêneros vivos. Globalmente, a distribuição de gêneros é: 8 gêneros encontrados na Malásia, Nova Caledônia e Nova Zelândia; 7 na Austrália; 4 na América do Sul, África e Ásia são encontrados 2 gêneros em cada continente. Todavia, ainda existem gêneros endêmicos de algumas regiões como exemplo: 3 gêneros na Austrália (*Lagarostrobos*, *Microcachrys* e *Pherosphaera*); 2 na Nova Zelândia (*Halocarpus* e *Manoao*); Nova Caledônia, América do Sul e África, com um gênero cada (*Parasitaxus*, *Saxehaha* e *Afrocarpus*, respectivamente)¹.

Dentre as 170 espécies pertencentes a família *Podocarpaceae*, 9 podem ser encontradas no Brasil, distribuídas por todas as regiões do país, exceto nos estados do Amapá, Tocantins, Maranhão, Rio Grande do Norte e Paraíba. São plantas que fazem parte da vegetação da Floresta Amazônica, da Caatinga, do Cerrado, da Mata Atlântica e dos Pampas. As espécies nativas encontradas no Brasil são: *Podocarpus acuminatus*, *Podocarpus aracensis*, *Podocarpus barretoii*, *Podocarpus brasiliensis*, *Podocarpus celatus*, *Podocarpus lambertii*, *Podocarpus roraimae*, *Podocarpus sellowii* e *Retrophyllum piresii*². Além das espécies nativas, outras foram introduzidas no território nacional, como por exemplo a *Podocarpus macrophyllus*. Essa é uma espécie nativa do sul do Japão e do sul e leste da China³. Pode ser comumente chamada de pinheiro-de-teixo, pinheiro-de-buda, pinheiro samambaia e pinheiro bravo. É uma planta com emprego ornamental que se caracteriza por ser uma conífera colunar, ereta, que pode alcançar de porte arbustivo a arbóreo, com até de 20 metros de altura. Sua folhagem é perene, compacta, de coloração verde-escura e brilhante, composta por folhas lineares. Por se tratar de uma planta dioica, apresenta plantas separadas para o sexo feminino e masculino. As flores são amarelas, discretas, surgem na primavera. Os pequenos frutos são de cor vermelha a arroxeada,

formados apenas nas plantas fêmeas, são comestíveis e atraem os pássaros⁴. A Figura 1.1 demonstra a *Podocarpus macrophyllus*.



Figura 1.1 Foto de exemplar da planta *Podocarpus macrophyllus*, com frutos e sementes.

Desde 1900, diversos estudos fitoquímicos levaram ao isolamento e à elucidação de vários metabólitos secundários de plantas desse gênero, e tal biblioteca de compostos demonstrou que esse gênero é um hábil produtor de compostos terpenoides e flavonoides. A classe de dilactonas norditerpênicas é a mais comum e presente na maioria das espécies de *Podocarpus*. A algumas dessas dilactonas diterpênicas apresentam-se glicosiladas com uma unidade de açúcar ou com dissacarídeo⁵. Outra classe de metabólitos secundários bastante comum em espécies do gênero *Podocarpus* são os flavonoides, sendo esses monoflavonoides, biflavonoides e flavonoides glicosilados. A presença de grupos metoxila e hidroxila nesses compostos desempenham um importante papel na mediação da atividade citotóxica desses compostos⁶. Além da atividade biológica, os mesmos também podem ser utilizados como marcadores quimiotaxinômicos, haja vista que biflavonoides do grupo da amentoflavona e hinokiflavona, juntamente com nor e bis-norditerpenos são compostos majoritários nas espécies de *Podocarpus*. Como exemplo, os gêneros *Dacrycarpus*, *Prumnopitys* e *Podocarpus* podem ser diferenciados pela presença de 3-metoxiflavonas no primeiro, enquanto que segundo

e terceiro são caracterizados principalmente pela presença majoritária de flavonoides glicosilados^{7,8}. A Figura 1.2 ilustra a diversidade estrutural encontrada nas plantas no gênero *Podocarpus*.

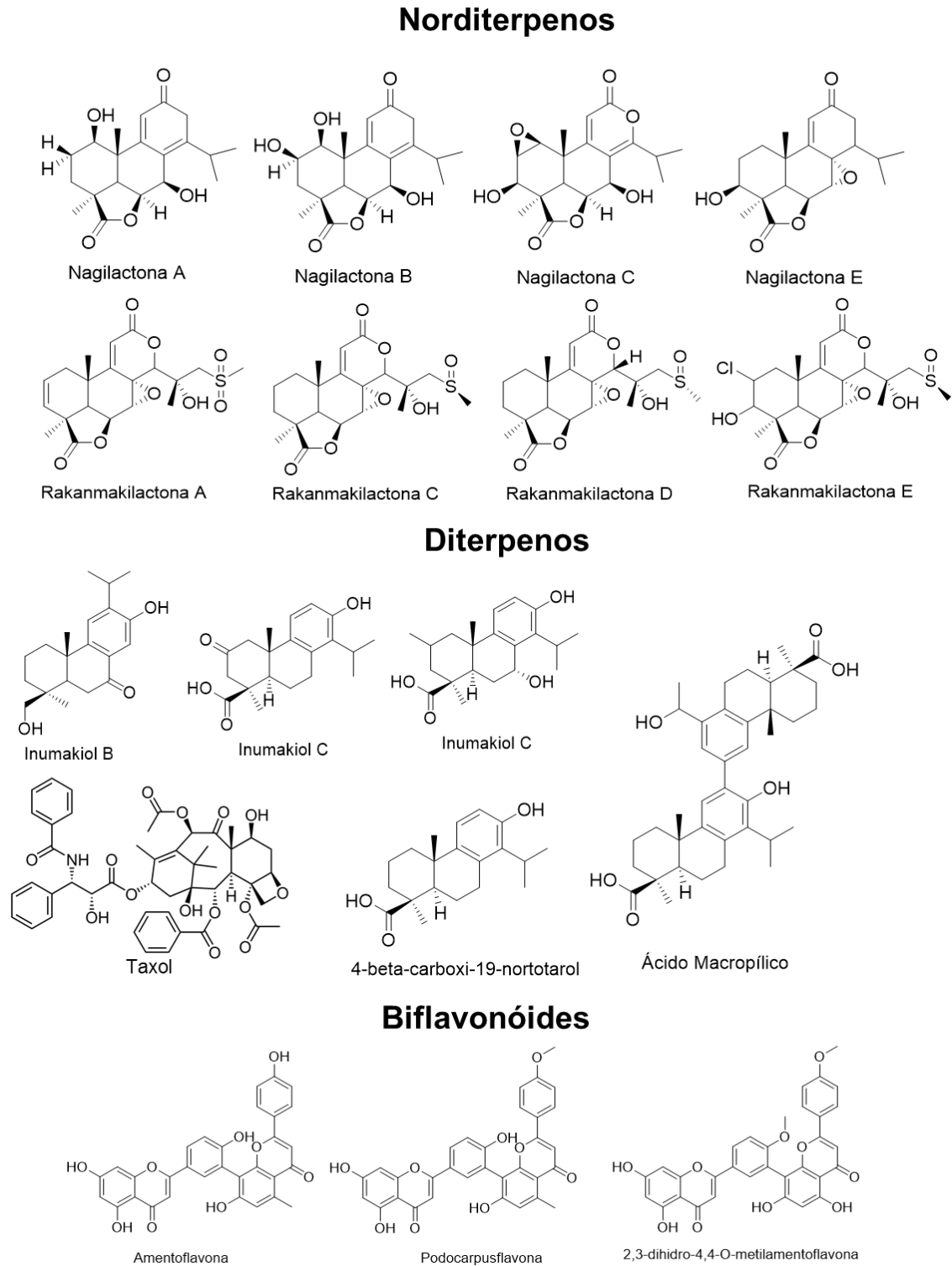


Figura 1.2 Ilustração da diversidade estrutural de compostos produzidos por indivíduos pertencentes ao gênero *Podocarpus*.

Rakanmakilactonas A–F, são dilactonas norditerpênicas contendo enxofre, com atividade citotóxica contra células leucêmicas⁹. Os isômeros da podolactona D também apresentaram atividade citotóxica contra células leucêmicas, sendo a IC₅₀ de 0,52 µg/ml para o isômero (S,R) - podolactona D e 0,23 µg/ml para o isômero (S,S)- podolactona D¹⁰. Os diterpenos Inumakiol B, inumakiol F, inumakiol H, ácido macrofilico, 4β-carboxi-19-nortotarol e ácido lambértico foram testados contra microrganismos *Staphylococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyomonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e para esses compostos foi observado MIC de 25–50 ppm, enquanto que o controle timol apresentou MIC variando de 100 a 200 ppm¹¹. As ponasterona A, B e C são fitoecdisteronas isoladas das espécies *P. nakaii*, *P. macrophyllus* e *P. nagi* com atividade hormonal em insetos. Tais compostos são empregados na produção de casulos de bicho da seda de alta qualidade. Este hormônio, quando administrado às larvas do bicho-da-seda, em um estágio posterior à fase de muda, aumenta a eficiência de alimentação e o rendimento dos casulos^{12,13}. Outro importante metabólito que também é isolado de indivíduos do gênero *Podocarpus* é o taxol que é um diterpeno que foi originalmente isolado de *Taxus brevifolia* e, posteriormente, foi isolado de *Podocarpus gracillior*. Esse composto inibe o crescimento de células cancerosas por meio da ligação à enzima tubulina, sendo assim um novo e promissor tratamento para várias formas de câncer. O totarol, também é um diterpenoide isolado de *Podocarpus*, exibiu atividade anti-tumoral com D50 de 4,9 µg/mL¹.

Atividade contra radicais livres e a influência na síntese de melanina nos melanócitos epiteliais do biflavonóide 2,3-diidro-4',4-di-O-metilamentoflavona, isolado do *P. macrophyllus var. macrophyllus*, foi avaliada, e verificou-se que tal composto apresenta baixa toxicidade para melanócitos. Além disso, na concentração de 0,098 mM foi verificada uma inibição de 50% da tirosinase, enquanto para obter a mesma taxa de inibição, foram necessários 3,0 mM do controle arbutina¹⁴. Embora as rotas biossintéticas para produção das principais classes de compostos isoladas das espécies pertencentes ao gênero *Podocarpus* estejam elucidadas, ainda é necessário adquirir mais informações da participação dos microrganismos endofíticos que colonizam a planta e se há uma coparticipação deles na biossíntese dos metabolitos da planta. Diante disso, é necessário conhecer melhor a composição da microbiota do

Podocarpus macrophyllus, haja vista que estudos relativos a bactérias endofíticas dessa planta são escassos na literatura.

1.2 Microrganismos endofíticos

Etimologicamente a palavra endófito é composta pelos prefixos gregos *endo* (dentro) e *phyton* (planta) e conseqüente a palavra significa “dentro da planta”. Todavia, microrganismos endofíticos podem ser definidos como microrganismos que colonizam o interior de tecidos da planta como por exemplo caule e folhas, além de flores, frutos ou sementes, e raízes. Esses microrganismos vivem nos tecidos das plantas sem causar danos substanciais ao hospedeiro, podendo residir dentro das células¹⁵, nos espaços intercelulares¹⁶, ou no sistema vascular da planta¹⁷.

Um grande número de espécies de bactérias endofíticas já foram catalogadas em diversas plantas, sendo essas pertencentes aos mais distintos gêneros como exemplo: *Achromobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Microbiospora*, *Micromonospora*, *Nocardioides*, *Pantoea*, *Planomonospora*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces* e *Thermomonospora*^{18,19,20,21}. Diversos estudos vêm demonstrado a importância dos microbiomas vegetais (epifíticos, endofíticos e rizosféricos), pois a presença desses microrganismos promove diretamente o crescimento das plantas por meio de diversos benefícios advindos da presença dos mesmos, como por exemplo: fixação do nitrogênio atmosférico; solubilização de minerais como fósforo, potássio e zinco; e produção de compostos sideróforos e hormônios de crescimento de plantas, tais como citocinina, auxina e giberelinas^{22,23,24,25,26,27}.

A microbiota associada à planta ainda pode promover o crescimento das plantas indiretamente por meio da produção de substâncias antagonistas, induzindo resistência contra patógenos. A síntese de substâncias tóxicas pode ser estimulada pela presença de enzimas ou outros compostos dos microrganismos endofíticos, que atuando sobre certos genes da planta promovem a biossíntese destes metabólitos secundários tóxicos, como mecanismo de defesa contra herbívoros²⁸.

Devido aos diversos benefícios trazidos a saúde da planta, esses microrganismos são classificados como microrganismos promotores do crescimento de plantas (PGPMs), por promoverem o crescimento das plantas em termos de

aumento das taxas de germinação; biomassa; área foliar; conteúdo de clorofila; teor de nitrogênio; teor de proteína; comprimento das raízes dos brotos; tolerância a estresses abióticos como seca, temperatura, inundação e salinidade. Devido a todas estas interações e benefícios à planta hospedeira, o conhecimento sobre a composição e diversidade da microbiota associada à planta desperta grande interesse devido ao imenso potencial biotecnológico dos microrganismos endofíticos.

A caracterização do microbioma associado à plantas hospedeiras é importante não só para estudar os benefícios advindos da interação entres esses organismos, assim como a possibilidade da descoberta de novos compostos bioativos. A vertente da interação entre microrganismo endofítico e planta hospedeira pressupõe que alguns microrganismos endofíticos podem adquirir a capacidade de biossintetizar compostos bioativos (metabólitos secundários) precursores dos metabólitos produzidos pelas plantas hospedeiras ou até mesmo os metabólitos secundários produzidos pelas plantas hospedeiras, de forma independente. Como exemplo pode-se citar a produção de taxol por diversas espécies de fungos endofíticos. Embora o rendimento de produção seja relativamente baixo em comparação com as plantas hospedeiras, essa desvantagem pode ser contrabalanceada pelo rápido crescimento em cultivos e da alta densidade celular, que tornam a aplicação em escala industrial promissora. A Tabela 1.1 lista fungos endofíticos produtores de taxol. A produção de taxol foi relatada em algumas bactérias, entretanto ela foi obtida por meio da expressão de enzimas heterólogas^{29,30,31}.

Tabela 1.1. Listagem de fungos endofíticos produtores de taxol isolados de diferentes plantas hospedeiras.

Microrganismo	Planta hospedeira
<i>Bartalinia robillardoides</i> AMB 9	<i>Aegle marmelos</i> Correa ex Roxb
<i>Bartalinia robillardoides</i> Tassi	<i>Aegle marmelos</i> Correa ex Roxb
<i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat.	<i>Cardiospermum helicacabum</i> Linn
<i>Pestalotiopsis pauciseta</i> Sacc.	<i>Justicia gendarussa</i> Burm. F
<i>Colletotrichum gleosporiodes</i> (Penz.) Sacc.	<i>Terminalia arjuna</i> (Roxb.) Wight and Arn
<i>Pestalotiopsis terminaliae</i>	<i>Rauvolfia tetraphylla</i> Linn
<i>Phomopsis arnoldiae</i> Sutton	
<i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat.	<i>Morinda citrifolia</i>
<i>Cladosporium</i> sp. F1&F3	<i>Taxus buccata</i>
<i>Epicoccum</i> sp., <i>mucor</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	<i>Taxus fauna</i>
<i>chaetomium</i> sp., <i>Paraconiothyrium</i> sp.	
<i>Fusarium solani</i>	<i>Taxus celebica</i>
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Taxodium mucronatum</i>
<i>Pestalotiopsis pauciseta</i> CHP-11	<i>Cardiospermum helicacabum</i> Linn
<i>Pestalotiopsis versicolor</i> P. neglecta	<i>Taxus cuspidata</i>

Vinte e quatro isolados fungos endofíticos foram isolados de folhas, caule e galhos de *Podocarpus gracilior*, sendo que três desses isolados, *Aspergillus terreus* EFB108, EFB59, EFB14, são produtores de Taxol. Ao ser cultivado o rendimento de produção de taxol, de *A. terreus* EFB108 foi de 265 µg/L. Contudo, quando em contato com folhas esterilizadas de *P. gracilior* o rendimento na produção de taxol aumentou para 432 µg/L. Esses resultados demonstram que a interação física de endófitos com seu hospedeiro pode ser essencial para ativar rotas biosintéticas³².

Em termos de interação de microrganismos endofíticos e planta hospedeira ainda pode ser observada indução do metabolismo secundário do hospedeiro pelo seu endófito. Em 1999, Schulz et al.³³ observou a indução da síntese de compostos fenólicos, relacionados à defesa, em raízes infectadas por endófitos. Outro exemplo é da gramínea *Lolium perene*, a colonização de plantas axênicas por endófitos da família Clavicipitaceae induziu a produção flavonoides glicosilados, ácidos hidroxicinâmicos e o ácido clorogênico.

Todavia, o tipo e quantidade de metabólitos produzidos variava de acordo com o tipo de endófito que colonizava a planta (Qawasmeh et al. 2012)³⁴. Em 1997, Strobel e Hess³⁵ observaram uma especificidade na inter-relação entre fungos

endofíticos e plantas hospedeiras. Ao colonizar uma espécie de *Taxus*, essa planta foi capaz de glicosilar um peptídeo derivado da leucinostatina A, produzido pelo fungo endofítico, enquanto para outros hospedeiros este composto poderia ser tóxico. Outro benefício da interação entre microrganismo e seu hospedeiro foi demonstrado por Tian et al.³⁶ em 2014. Foi demonstrado que um endófito da *Cephalotaxus harringtonia* promovia a biotransformação de flavonoides glicosilados. O processo de desglicosilação levava à produção da aglicona, além disso, os flavonoides desglicosilados demonstraram indução no crescimento das hifas e na germinação dos esporos. Por fim, outro exemplo relativo à interação e seleção da microbiota pode ser observado no milho. Essas plantas produzem benzoxazinoides como forma de defesa contra diversas pragas. Entretanto, tais compostos são tóxicos em sua forma glicosilada, enquanto a desglicosilação leva a um metabólito não tóxico. Dessa forma, a seleção de microrganismos tolerantes ocorre por meio da capacidade de produzir a enzima responsável pelo processo de desglicosilação³⁷.

1.2.2 Isolamento e caracterização da microbiota

Tendo em vista o objetivo de isolar e caracterização o microbioma associado às plantas hospedeiras é necessário ter em mente que a diversidade desse sistema é largamente influenciada pelas condições ambientais da região nas quais plantas hospedeiras se localizam, como por exemplo: o tipo, composição e o pH do solo; o índice de precipitação da região; a salinidade do solo e a variação de temperatura. Entretanto, para se analisar a diversidade total e a distribuição dos microrganismos associados à planta hospedeira, sejam esses associados epifiticamente, endofiticamente ou à rizosfera, deve-se ter em mente a seleção e aplicação das técnicas adequadas para a identificação dos microrganismos cultiváveis e não cultiváveis, conforme os objetivos do estudo²⁹.

O isolamento de endófitos pode ser seriamente prejudicado pela contaminação com microrganismos epifíticos indesejáveis, portanto é imprescindível a esterilização adequada dos tecidos vegetais coletados. Resumidamente, o protocolo de isolamento consiste nas etapas de esterilização de toda a superfície das amostras, seguindo-se do corte de órgãos e tecidos em pedaços com um bisturi esterilizado, sendo que as etapas de esterilização podem ser aplicadas mais de uma vez antes das etapas finais do isolamento e incubação. O procedimento de esterilização das

plantas geralmente ocorre, de maneira simplificada, através da imersão sequencial em etanol 70% por 1-3 min e hipoclorito de sódio a 1% -3% por 3-5 minutos, tendo em vista que hipoclorito de sódio é o desinfetante mais utilizado nesse tipo de procedimento, seguido por sucessivas lavagens com água estéril para remoção do hipoclorito de sódio residual³⁹. Posteriormente à esterilização, os microrganismos podem ser isolados por meio da segmentação da amostra com incubação dos fragmentos no meio de cultura adequado ou a partir da maceração da amostra com 10 mL de NaCl 0,85% estéril ou meio de cultura líquido, usando um almofariz e pilão e ainda homogeneização por vórtex durante 60 s à alta velocidade. As soluções resultantes são usadas para isolar ainda mais microrganismos durante o processo de incubação.

Além dos cuidados com a seleção da metodologia para a identificação dos microrganismos endofíticos cultiváveis e não cultiváveis, também é necessário se atentar à escolha do meio de cultura a ser utilizado e das condições de cultivo tendo em vista maximizar a quantidade de isolados de diferentes gêneros e garantir que a microbiota isolada seja representativa da planta hospedeira. Como exemplos de meios de cultura e tipos de microrganismos pode-se citar: para microrganismos heterotróficos (ágar nutriente), *Pseudomonas* (ágar King's B), *Arthrobacter* (ágar triptona soja), microrganismos específicos do solo (ágar extrato de solo), gêneros *Bacillus* (T₃A com métodos de tratamento térmico), *Archaea* (meio quimicamente definido e complexo) e fungos (ágar dicloran rosa bengala e batata dextrose)^{19,40,41}. Os microrganismos também podem ser selecionados quanto a sua tolerância à temperatura, salinidade, disponibilidade de água e pH. As condições de cultivo que podem ser usadas para o isolamento são: halofílicos (com concentração de 5% a 20% de NaCl), tolerantes à seca (7% a 10% de polietilenoglicol), acidófilos (pH entre 3 a 5), alcalifílico (pH entre 8 a 11), psicofílico (incubação à temperatura inferior a 5 °C) e termofílico (incubação à temperatura superior a 45 °C)⁴².

A principal maneira de identificação dos microrganismos isolados é por meio do sequenciamento do DNA, para tal finalidade o mesmo pode ser extraído utilizando kits como por exemplo do Zymo® Research Fungal/Bacterial conforme o protocolo padrão estabelecido pelo fabricante. As regiões 16S rRNA (*Archaea* e bactérias) e 18S rRNA podem ser amplificadas utilizando diferentes *primes*. Os genes 16S/18S rRNA são então amplificados e purificados, e posteriormente, sequenciados. As sequências parciais são então comparadas com sequências disponíveis na base

de dados do NCBI, e a árvore filogenética pode ser construída em conjuntos através do alinhamento dos dados. Para a identificação dos caracterização de microrganismos não cultiváveis é necessário promover a lise celular e a extração de DNA contido nos tecidos das plantas. Para isso, ao tecido do qual o DNA será extraído deve ser adicionado, em um tubo de centrífuga de 30 mL, com solução de SDS, tampão fosfato e o pH deve ser ajustado para 7. A adição de pérolas de vidro e a agitação em sistema vórtex promovem a extração do DNA. O sobrenadante deve ser separado por meio de centrifugação por 10 min a $10.000 \times g$, e em seguida o DNA é precipitado em isopropanol, acetato de sódio 0,3 M e pH 5,2 por cerca de 2 h a -20°C . O sedimento de DNA é separado por centrifugação, seco a vácuo e ressuspendido em água para então ser purificado para obter o extrato de DNA, que é denominado de metagenoma. Esse, por sua vez, pode ser diretamente sequenciado utilizando um *primer* específico (*Archaea* /bactéria/ fungos), pode ser clonado em vetor adequado para gerar a biblioteca metagenômica, ou ainda pode ser amplificado usando iniciadores universais para gerar a biblioteca do gene 16S/18S rRNA²⁹.

1.3 MALDI-TOF MS para a identificação de microrganismos

Vários métodos têm sido comumente empregados para a detecção e identificação de microrganismos em microbiologia clínica, com suas respectivas vantagens e desvantagens, conforme listados na Tabela 1.2⁴³.

Tabela 1.2. Comparação entre as diferentes metodologias de identificação de microrganismos.

Método de detecção	Vantagens	Desvantagens
Cultura e testes bioquímicos (Convencional)	Sensível e barato	Tempo requerido de 24 a 48 horas
Imunológico	Mais rápido que os métodos convencionais; Detecção de microrganismos contaminantes e toxinas.	Não é específico, sensibilidade e rápido como os métodos baseados na detecção de ácidos nucleicos. Requer grande quantidade de antígenos. Desenvolvido para um número reduzido de microrganismos.
Fluorescência	Rápida detecção. De fácil uso de combinação com métodos moleculares.	Limitado à detecção de antígenos específicos.
Métodos Moleculares: I) Real-time PCR II) Multiplex PCR	Sem necessidade de cultivo da amostra. Específico, sensível, rápido e acurado. Baixo risco de contaminação. Pode detectar vários microrganismos simultaneamente. Pode detectar microrganismos não cultiváveis	Condições precisas para cada experimento. Requer treinamento laboratorial específico para execução.
Sequenciamento de DNA	Pode detectar vários microrganismos simultaneamente. Pode detectar microrganismos não cultiváveis	Requer treinamento laboratorial específico para execução, e operação de <i>softwares</i> de interpretação de dados.
Microarranjo	Identificação e detecção de microrganismos em larga escala de operação	Caro. Requer treinamento laboratorial específico.
Ensaio de amplificação em looping (LAMP)	Pode gerar muitas cópias de DNA. Fácil uso. Equipamentos de baixo custo.	Desenvolvido para um número reduzido de microrganismos
Ensaio metagenômicos	Identificação de contaminação.	Tempo para aquisição de processamento de dados. Treinamento específico.
MALDI-TOF/MS	Rápido. Acurado. Mais barato que métodos moleculares e imunológicos.	Alto custo inicial para aquisição do equipamento e <i>software</i> .

O Proteoma designa o conjunto de proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo em um determinado momento. A Proteômica consiste na análise das proteínas expressas por meio de técnicas de separação e identificação das mesmas, tais como eletroforese, cromatografia, espectrometria de massas associadas a ferramentas de bioinformática. Tal método ocupa uma posição intermediária em relação aos métodos baseados em características fenotípicas e genotípicas, uma vez que as proteínas analisadas refletem o genoma e as funções metabólicas de um dado organismo. A aplicação dos métodos baseados no “*fingerprinting*” de DNA estabeleceu-o como inequívoco na identificação e classificação de microrganismos. Todavia, devido às vantagens da proteômica, aliada a sua possibilidade de automatização, essa técnica tornou-se de grande interesse devido a sua aplicabilidade aos mais diversos tipos de problemas como por exemplo: estudos epidemiológicos, identificação da microbiota de ecossistemas, detecção de agentes biológicos de guerra, detecção de patógenos transmitidos por alimentos, detecção de patógenos no sangue e no trato urinário, detecção de resistência a antibióticos etc.⁴³.

O desenvolvimento da técnica analítica de espectrometria de massas data do início de 1900, e seu funcionamento baseia-se na medição da razão de massa/carga (m/z) de compostos químicos ionizados em moléculas carregadas. Anteriormente, seu escopo estava restrito a um pequeno número de aplicações até o desenvolvimento de novas fontes de ionização na década de 80, ionização por *electrospray* (ESI), Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), as quais aumentaram significativamente a aplicabilidade da espectrometria de massas, em especial a grandes moléculas biológicas como proteínas.

Ambas as técnicas de ionização citadas anteriormente são métodos brandos de ionização, nas quais os peptídeos são ionizados por meio da adição ou perda de um ou mais de um próton e não há perda significativa da integridade da amostra por meio de fragmentação. Contudo, o MALDI-MS é uma boa escolha para a aplicação em proteômica devido a algumas vantagens sobre o ESI-MS: alto rendimento e a velocidade associados à automação completa; produz íons monocarregados que facilitam a interpretação dos dados; não há necessidade prévia de separação cromatográfica para realização das análises⁴⁴. O desenvolvimento instrumental da técnica analítica de MALDI TOF-MS data do final da década de 40,

quando em 1946, Stephens descreveu o conceito do analisador por tempo de voo e em 1955, Wiley e McLaren publicaram o *design* do primeiro TOF linear [ref]. Já o conceito da ionização por MALDI deu-se a partir dos experimentos desenvolvidos por Michael Karas, que conseguiu promover a ionização de alanina a partir da incidência de um laser pulsado de 266 nm para a matriz utilizada, no caso triptofano. Em 2002, Koichi Tanaka recebeu o prêmio Nobel de Química por demonstrar que proteínas podem ser ionizadas dependendo da a correta combinação de matriz e comprimento de onda do laser. Em seus experimentos, foi demonstrada a ionização da proteína carboxipeptidase-A, 34472 Da, utilizando partículas de cobalto em glicerol e laser de nitrogênio (337 nm). [ref]

Nas análises por MALDI as amostras são preparadas por meio do revestimento ou mistura dela com uma solução de um composto orgânico denominado matriz. Uma boa candidata a matriz de ionização deve apresentar algumas características para que possa ter aplicabilidade, como por exemplo: ser capaz de se misturar ao analito para que ocorra a cristalização, deve ser solúveis em solventes compatíveis com o analito, estável em condições de vácuo, promover co-dessorção do analito em resposta a irradiação do laser e provocar a ionização do analito. As etapas para ionização do analito consistem na secagem da solução, e co-cristalização com retenção da amostra na matriz, posteriormente a mesma é ionizada de maneira automatizada por um feixe de laser. A incidência do laser sobre a matriz provoca a dessorção e a ionização do analito em íons monoprotônicos. Existem uma variada gama de matrizes de ionização, para os mais diversos tipos de analitos⁴⁴. Entretanto, em análises microbiológicas, as matrizes ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), o ácido 2,5-diidroxibenzoico (DHB) e o ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico (ácido sinapínico - SA) são consideradas as mais eficientes para tal aplicação. O preparo da solução da matriz consiste na dissolução da mesma em solução de água e solventes orgânicos como etanol, metanol ou acetonitrila e um ácido forte como o ácido trifluoroacético (TFA). Os solventes penetram a parede celular dos microrganismos e extraem as proteínas intracelulares que são co-cristalizadas quando o solvente evapora^{43,44}.

Dois mecanismos podem descrever a formação de íons utilizando a fonte de MALDI, sendo eles os modelos de “Protonação em Fase Gasosa” e de “*Lucky Survivors*”. O modelo de “Protonação em Fase Gasosa” consiste na transferência das

moléculas da matriz e do analito, da fase sólida para a gasosa, por meio da dessorção e formação de uma pluma de materiais sobre a superfície incidida pelo laser. O processo de transferência de carga, entre as moléculas da matriz e do analito, ocorre no interior desta pluma, de modo que íons protonados $[M+H]^+$ e na forma de adutos de metais alcalinos $[M+Metal]^+$, podem ser formados. No modelo “Lucky Survivors”, o analito é incorporado na matriz durante a co-cristalização, e já se encontra protonado por devido adição do ácido trifluoracético. No processo de dessorção, parte destes íons é reneutralizada pela presença de contra-íons, sendo detectados apenas aqueles que sobrevivem a este processo. Recentemente, Karas et al., propuseram um mecanismo unificado que consiste na contribuição dos modelos de “Protonação em Fase Gasosa” e de “*Lucky Survivors*” para o processo de ionização. [8,9]

Em aplicações microbiológicas os analisadores do tipo TOF, ilustração na Figura 1.3, são preferencialmente empregados devido a sua ampla faixa dinâmica. Nesse tipo de analisador, os íons gerados após o processo de dessorção e ionização induzida por laser, são acelerados, sob potencial fixo, para o interior do tubo de vôo no qual são separados. A razão m/z de um íon é determinada indiretamente por meio do tempo necessário para que o íon acelerado percorra o comprimento do tubo de vôo até ser detectado pelo sensor. O rearranjo das equações 1, 2 e 3 levam a equação 4 que relaciona o tempo de vôo do íon com a relação massa carga. Sendo que t , L , m , Z , e , V_s são o tempo de vôo, o comprimento do tubo de vôo, a massa do íon, a carga, a carga de um elétron e o potencial aplicado, respectivamente. [ref Hoffman]

Temos que:
$$E_k = \frac{mv^2}{2} = qV_s = zeV_s = E_{el} \quad \text{Eq. 1.1}$$

Sabemos que:
$$v = \left(\frac{2zeV_s}{m}\right)^{1/2} \quad \text{e} \quad v = \frac{L}{t} \quad \text{Eq. 1.2 e 1.3}$$

Obtemos que:
$$t = L \left(\frac{m}{2zeV_s}\right)^{1/2} \quad \text{Eq. 1.4}$$

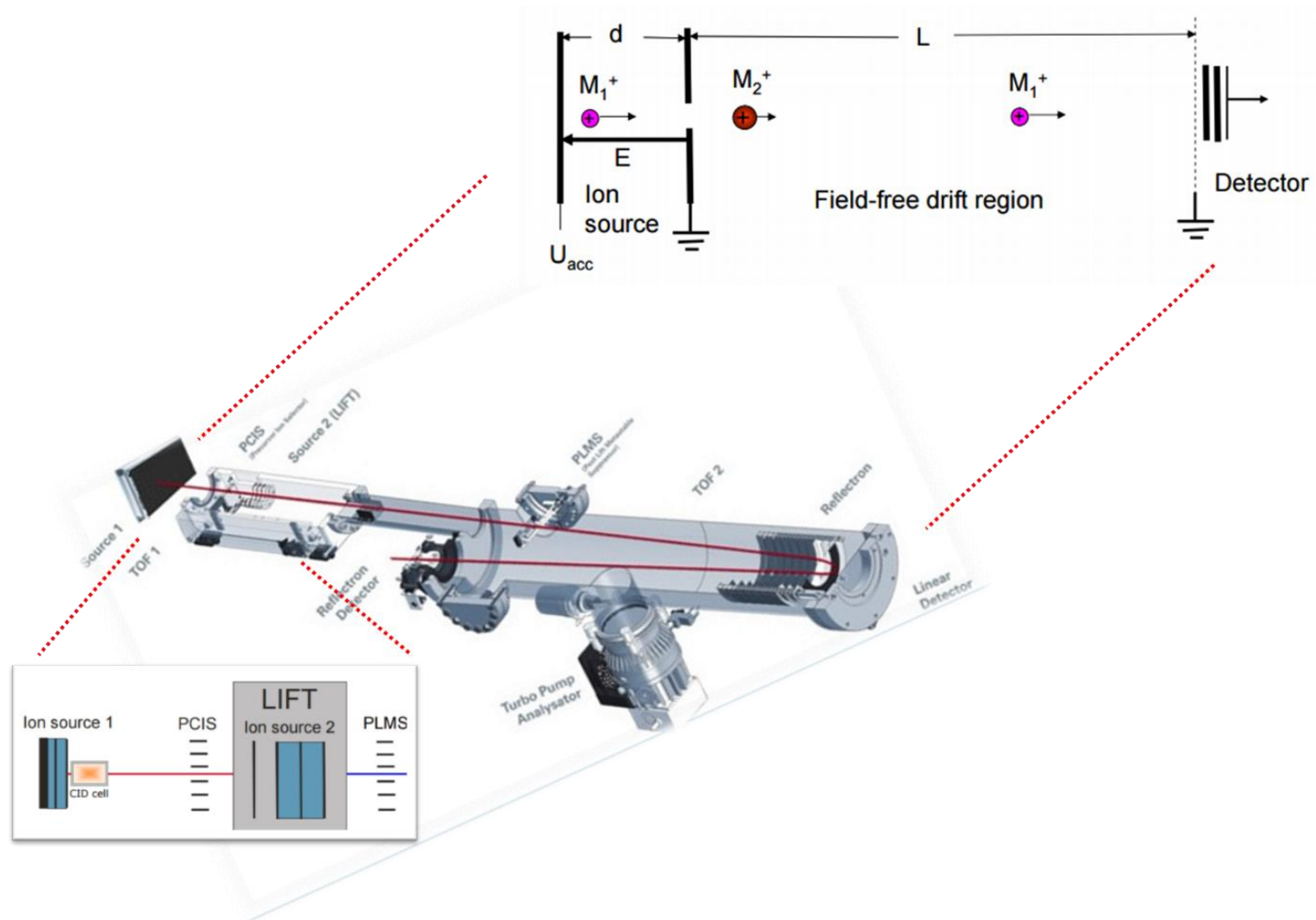


Figura 1.3. Esquema de um espectrômetro de massas do tipo MALDI - TOF/TOF MS.

Na extremidade de um analisador de TOF pode ser incorporado um espelho iônico, que é composto por uma região na qual é aplicado um campo elétrico com intuito de refletir os íons através do tubo de vôo para um segundo detector. Conseqüentemente, há um incremento no comprimento do tubo de vôo que traz como benefício a correção de pequenas diferenças de energia entre os íons e aumento da resolução e exatidão⁴⁴. Outro benefício oriundo a existência de dois analisadores de massas no mesmo instrumento é a possibilidade de realização de experimentos de fragmentação. Conforme pode-se observar na Figura 1.3, logo acima do *target* do MALDI há a região de *CID* (Colisão Induzida por Colisão). Nessa região há a adição de gás inerte com o qual os íons acelerados colidem. Posteriormente, na “*ion source 2*” os potenciais aplicados são ajustados de maneira a desestabilizar e eliminar os íons em meta estado e acelerar os fragmentos do íon precursor obtidos no experimento de *CID*. No primeiro TOF há a separação dos fragmentos do íon precursor, que são focalizados e detectados por meio do segundo TOF. [ref Hoffman]

A identificação de microrganismos é realizada a partir de um espectro de massas característico obtido por MALDI-TOF MS, o qual é denominado de “impressão digital de massa de peptídeo” (PMF). O espectro adquirido para o microrganismo desconhecido é então comparado aos PMFs contido nos bancos de dados, ou os biomarcadores dos microrganismos desconhecidos são comparados com os dos bancos de dados de proteoma. Em geral, o método para a identificação de microrganismos utiliza a faixa de dinâmica de m/z de 2 a 20 kDa. Um banco de dados robusto é o cerne da utilização da técnica de MALDI-TOF MS como ferramenta na caracterização e identificação dos microrganismos. Devido a esse fato, as plataformas comerciais aumentam continuamente o tamanho do banco de dados de seus *softwares* em número de cepas, novas espécies microbianas e demais anotações. Os sistemas produzidos pelas empresas Bruker® e Shimadzu® são bons exemplos de *softwares* no mercado, devido a sua representatividade graças à grande coleção de organismos, e aos algoritmos utilizados nos programas de identificação, de forma que produzem resultados com baixas taxas de falsos positivos.

Raramente os microrganismos isolados são identificados erroneamente, e nos casos onde os organismos não são identificados a falha geralmente é atribuída a falta de dados relativos ao “*fingerprint*” desse microrganismo nos bancos de dados. Esse é o grande desafio da aplicação dessa ferramenta na área de produtos naturais

com foco no estudo de microrganismos endofíticos, devido à necessidade de estudos sistemáticos e criteriosos para elaboração de banco de dados “*home made*”.

A grande desvantagem da utilização desses *softwares* e seus bancos de dados é o fato de que esses são proprietários e sua acessibilidade é limitada devido aos elevados custos de aquisição⁴⁵. Entretanto, existem algumas opções *open source* de iniciativa de alguns grupos de pesquisa que desenvolveram *softwares* e bancos de dados de código aberto que estão disponíveis gratuitamente para a comunidade científica. Dentre eles podem-se citar os *softwares*: mMASS, Mass-Up, pkDACLASS, MALDIquant, SpectraBank, BIOSPEAN⁴⁶⁻⁵¹.

Os biomarcadores que constituem uma “impressão digital” do microrganismo, de modo que o mesmo pode ser classificado taxonomicamente com relação ao gênero, espécie e subespécie por meio desses padrões, não são parte fundamental do trabalho, não havendo necessidade da elucidação dos mesmos. Entretanto, os biomarcadores utilizados em MALDI-TOF MS foram inicialmente atribuídos a proteínas altamente abundantes e conservadas, apresentando massas moleculares em torno de 4 a 15 kDa, sendo atribuídos a proteínas ribossômicas.

Tal afirmação foi baseada em experimentos de espectrometria de massas de alta resolução com o intuito de se identificar tais biomarcadores. Embora tenha-se verificado experimentalmente que proteínas ribossomais são os biomarcadores identificados pela técnica de MALDI-TOF MS, essas não são as únicas moléculas que atuam como biomarcadores na identificação de bactérias⁵²⁻⁵⁴. Proteínas ribossomais são parte do maquinário translacional celular, além disso os ribossomos estão localizados no citoplasma da célula.

Proteínas ribossomas são ótimos biomarcadores para MALDI-TOF MS, haja vista o seu tamanho modesto e a alta eficiência de ionização. Além disso, em células de crescimento rápido tais proteínas são extremamente abundantes o que facilita ainda mais sua detecção, mas além desses biomarcadores clássicos, proteínas periplasmáticas também demonstraram ser bons biomarcadores para MALDI-TOF MS. O periplasma é uma matriz concentrada, parecida com gel, contida na região subcelular entre as membranas interna e externa nas bactérias gram-negativas e da membrana interna e a parede celular externa nas bactérias gram-positivas. Tais proteínas estão frequentemente associadas a respostas dos microrganismos a condições do meio, essas apresentam funções como: sinalização e resposta ao

estresse gerado pelo ambiente externo; condições de pH; condições ocasionadas por temperatura do meio; resposta ao estresse osmótico e oxidativo, etc^{55,56}.

A caracterização e identificação de microrganismos patogênicos e com resistência antimicrobiana é um dos grandes desafios e a utilização de MALDI-TOF MS como ferramenta pode acelerar e facilitar tal processo. Microrganismos patogênicos podem gerar fatores de virulência, os quais são moléculas expressas por esses agentes e que atuam durante o processo de desenvolvimento da doença. Tais moléculas atuam de diversas formas no organismo do hospedeiro, como por exemplo: permitir a colonização e a adesão em células em um nicho ecológico no seu hospedeiro; liberação de fatores tóxicos; evasão do sistema imunológico do hospedeiro; imunossupressão; obtenção a partir do hospedeiro.

Além da identificação taxonômica, a identificação dos fatores de virulência é fundamental para a completa caracterização do microrganismo e sua patogenicidade. No entanto, tais moléculas são expressas sob condições de estresse (estresse em meio ácido, dano ao DNA, exposição a antibióticos, estresse osmótico, etc.), nas quais certos genes, que anteriormente estavam inativos ou fracamente expressados, são “ativados”^{57,58,59}.

Tendo em vista que a identificação taxonômica por MALDI-TOF MS é baseada na identificação e reconhecimento dos padrões de biomarcadores é plausível que tal ferramenta possa ser empregada também na identificação de microrganismos patogênicos e resistentes aos antibióticos. Não está claro até que ponto as cepas resistentes a antibióticos podem ser distinguidas por MALDI-TOF-MS. Para tanto, tal procedimento pode exigir o cultivo de uma mesma linhagem sob diversas condições com o intuito de se expressas os fatores de virulência.

Além disso, os resultados dependeriam de alterações no perfil do espectro de massas adquirido, e da correlação dessas alterações do perfil a da exposição às condições de cultivo que causariam a regulação da síntese desses fatores, desse modo poderia se observar uma diferença distinta entre cepas sensíveis e resistentes a antibióticos ou cepas patogênicas ou não.

2 Objetivos

Isolar as bactérias associadas à planta *Podocarpus macrophyllus*.

Adquirir o *fingerprint* de MALDI-TOF MS(+) para as bactérias isoladas.

Comparar os *fingerprints* adquiridos com os contidos na biblioteca do *software* Biotyper® e proceder com a identificação dos isolados.

Desenvolver uma metodologia para avaliação da comunidade bacteriana utilizando dados de MALDI TOF-MS.

2.1 Objetivos Específicos

Avaliar sazonalmente a comunidade de bactérias cultiváveis associada à planta *Podocarpus macrophyllus* e identificar os microrganismos mais comuns associados à planta.

Avaliar as influências sazonais e regionais sobre a comunidade de bactérias cultiváveis associada à planta *Podocarpus macrophyllus* e determinar as alterações na composição da comunidade influenciadas pela região em que se encontram as plantas e a estação do ano em que os microrganismos foram isolados.

Monitorar as alterações na composição relativa da comunidade de bactérias cultiváveis e determinar se há algum microrganismo comumente associado à planta e se há alteração na frequência de isolamento deles.

Elaborar um banco de *fingerprints* das bactérias isoladas de *Podocarpus macrophyllus*, para ser depositado na biblioteca do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos (LaBioMMi).

Comparar o banco de *fingerprints* das bactérias isoladas de *Podocarpus macrophyllus* com os de outras plantas que se encontram depositados na microteca do LaBioMMi.

Avaliar as ferramentas disponíveis no *software* Biotyper® para a comparação, distinção e triagem de microrganismos isolados de diferentes plantas.

3 Métodos

3.1 Materiais e reagentes utilizados para o cultivo e isolamento de microrganismos

Mueller Hinton - marca: HIMEDIA®

Agar Nutriente - marca: HIMEDIA®

Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico - marca: Sigma Aldrich®

Acetonitrila HPLC – marca: Panreac®

Isopropanol HPLC – marca: Sigma Aldrich®

Glicerol – marca: Synth®

Etanol 70 %

Hipoclorito de sódio 4%

Água destilada

Água MilliQ

Alça

Bisturi

Pinça

Alicate de poda

Espátula

Bastão de vidro

Palito de dente

Papel de filtro

Becker 250 mL

Erlenmeyer 1000 mL

Placa de petri 9 mm

Papel de filtro qualitativo (80 g/m², 11 cm) UNIFIL® e n° 1 WHATMAN

Eppendorf 2 mL

3.2 Equipamentos utilizados para o cultivo e isolamento de microrganismos

Autoclaves PHOENIX® AV 30 e AV 75

Balanças Tecnal® Mark 210 A Classe I, Mark 2200 classe II e Shimadzu AUY220

BOD Tecnal® TE-371 e TE391

Câmara de fluxo laminar vertical PACHANE® modelo 50

Estufa Bacteriológica

3.3 Equipamentos utilizados para a identificação dos microrganismos isolados

Espectrômetro de massas BRUKER® Autoflex Speed MALDI-TOF/TOF no modo positivo, equipado com Smartbeam-II laser technology com taxa de repetição ajustável até 1 kHz (355 nm), operando em modo linear e controlado pelo software FlexControl® versão 3.3 da Bruker Daltonics® com aquisição automática de dados

Sistema de água ultrapura ELGA® Purelab Classic modelo CLXXXUVM

Target para MALDI-TOF BRUKER® MTP-384 ground steel TP S/N 05480 part number 209519

Estufa bacteriológica

Estufa FANEM® 315 SE

pHmetro Tecnal® Tec-3MP

Ultrassom UNIQUE® USC-1800A

Pipeta automática 10 µL Eppendorf®

Pipeta automática 1000 µL Eppendorf®

Ponteira descartável 100 µL

Ponteira descartável 1000 µL

3.4 Softwares utilizados no processamento dos dados dos experimentos de indentificação de microrganismos endofíticos e avaliação da comunidade bacteriana associada a *Podocarpus macrophyllus*

flexAnalysis 3.3 (Build 65) Bruker® Daltonics GmbH

MALDI Biotyper® OC 3.1 Bruker® Daltonics GmbH

Excel® pacote office 365

PAST® 3.16

3.5 Material vegetal

Os experimentos de isolamento e identificação de microrganismos, por *fingerprints* obtidos através da utilização de MALDI-TOF MS, foram realizados no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos (LaBioMMi), do Departamento de Química (DQ UFSCar), sob orientação do Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho. O estudo foi conduzido com amostras de *Podocarpus macrophyllus* coletadas na Rua Ray Wesley Herrick, 1501 - Jardim Jockey Clube (-21,975522, -47,899840).

Um único indivíduo foi acompanhado ao longo de um ano, através de sucessivos processos de isolamentos sazonais (novembro, fevereiro, maio e agosto), iniciando em maio de 2015 e finalizando em fevereiro de 2016, à fim de se avaliar qualitativamente a comunidade de bactérias cultiváveis associada à planta, e quais seriam os microrganismos endofíticos mais comumente associados. O material vegetal foi coletado a cerca de 2 metros do solo, sendo que 3 galhos foram cortados à mesma altura para se realizar o procedimento de isolamento dos microrganismos do caule e folhas, nas estações de outono e inverno; e do caule, folhas, flores, frutos e semente, nas estações de primavera e verão.

Além do acompanhamento da prospecção de avaliação das principais bactérias endofíticas associadas à *Podocarpus macrophyllus*, também foi realizado um experimento para se avaliar as influências sazonais e regionais sob a composição da comunidade de bactérias endofíticas cultiváveis. A Figura 1.4 ilustra as condições do experimento de comparação das comunidades de bactérias cultiváveis das plantas de São Carlos e Araraquara.

Nestes experimentos foram cortados três galhos a cerca de 2 metros do solo, de 8 indivíduos da espécie *Podocarpus macrophyllus*. As amostras foram coletadas na Rodovia Washington Luís, s/n, Km 235, São Carlos - SP, 13565-905, Brasil (-21,989666, -47,882493) e na Av. Dr. Adhemar Pereira de Barros, 201 - Vila Melhado, Araraquara - SP, 14807-000, (-21,807499, -48,164889), sendo 4 indivíduos em cada localidade. Os procedimentos de isolamento foram realizados nos meses de agosto e outubro, representando as estações de inverno e primavera.



Figura 1.4. Condições climáticas, nas estações de inverno e primavera, e localidades de coleta de material do experimento de comparação das comunidades de bactérias cultiváveis.

3.6 Metodologia de isolamento dos microrganismos endofíticos associados à *Podocarpus macrophyllus*

O procedimento de isolamento foi realizado segundo o protocolo de segmentação descrito por Petrini et al.⁶⁰, com adaptações. As partes oriundas do material vegetal dos três galhos foram separadas e agrupadas em caule, folha, flores, frutos e sementes. Os grupos foram homogeneizados e a quantidade de material foi reduzida por meio de quarteamento até a obtenção da amostra final.

O procedimento de esterilização consistiu primeiramente na lavagem da amostra em água corrente e posteriormente a mesma foi limpa em banho ultrassom por 5 minutos. Tais etapas foram empregadas para a remoção da sujeira superficial e materiais aderidos à superfície do vegetal. O procedimento de assepsia superficial foi realizado através do emprego do protocolo de lavagem com etanol 70% por 1 minuto seguido pelo enxágue em água destilada estéril por 30 segundos. Em seguida o material foi submetido à lavagem em hipoclorito de sódio a 4% por 1 minuto seguido pelo enxágue com água destilada estéril por 30 segundos. Por fim, o material foi

submetido novamente a lavagem em etanol 70% por 1 minuto e enxague com água destilada por 30 segundos.

A amostra estéril foi cortada em pedaços de aproximadamente 1 cm² e 6 fragmentos foram colocados em contato com o meio de cultura Nutriente Agar, contido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, e incubadas a 28 °C em BOD por cerca de 21 dias. Todos os procedimentos de isolamento foram realizados em triplicata. A Figura 1.5 ilustra uma placa ao final do protocolo de desinfecção e após 7 dias de incubação a 28 °C.

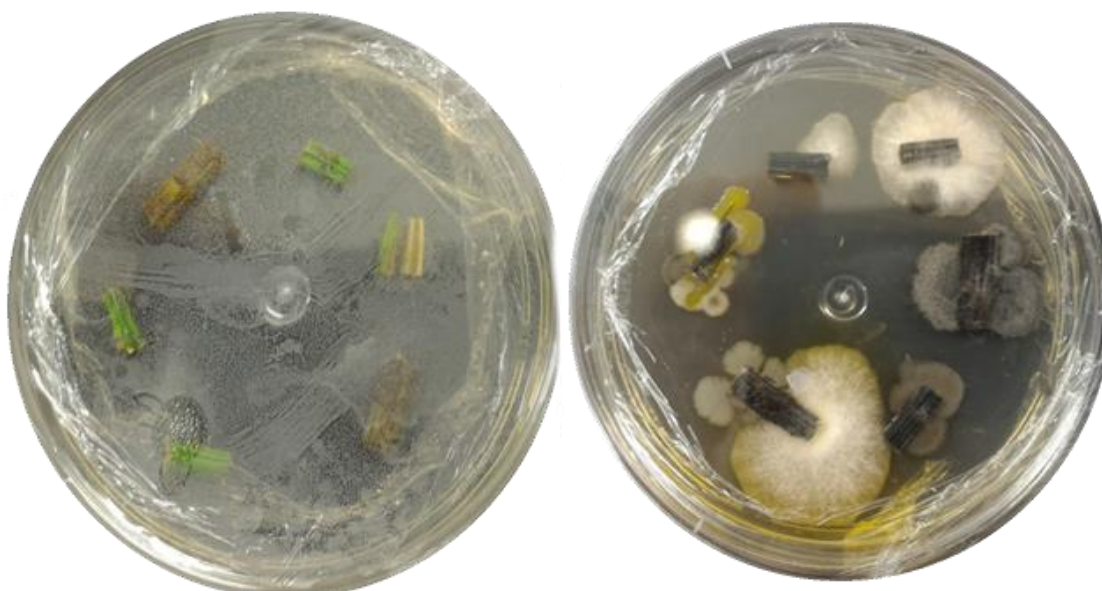


Figura 1.5. Demonstração das placas de isolamento para caule de *Podocarpus macrophyllus* após desinfecção e após 7 dias de incubação.

3.7 Metodologia de preparo das amostras para aquisição dos espectros de MALDI - TOF MS

A metodologia empregada no preparo das amostras visava a utilização de células intactas que propiciam a rápida aquisição com pouquíssimo pré-tratamento da amostra e a aquisição de espectros com maior número de sinais quando comparados a outras metodologias de preparo de amostra^{61,62}.

A amostragem consistia no esfregado direto, com o auxílio de um palito de madeira, do material biológico proveniente de uma colônia da placa de cultura, sobre o *spot* da placa de análise. Posteriormente, o volume de 1 µL de solução de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico na concentração de 20 mg.mL⁻¹, preparada em

solução 1:1 v/v de acetonitrila/água com 0,1% ácido trifluoroacético, foi aplicada sobre o *spot* da amostra com posterior evaporação do solvente a temperatura ambiente. Cada microrganismo isolado foi cultivado em triplicata e cada um desses foi aplicado em 16 *spots* da placa de análise, de forma que o total de 48 espectros foram adquiridos, com os mesmos parâmetros de aquisição de dados, para cada isolado.

3.8 Metodologia de aquisição de espectros MALDI-TOF MS

Os espectros foram adquiridos em um espectrômetro de massas Bruker *Autoflex speed* (Bruker Daltonics®, GmbH) equipado com o laser *Smartbean II* (355 nm) e operado pelo *software flexControl®* (versão 3.3, Bruker Daltonics®, GmbH). O equipamento foi previamente calibrado com o padrão BTS (Bacterial Test Standard, Bruker Daltonics®, GmbH) ou a cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922 CHB ou DH5alpha BRL, com 24 horas de incubação a 37°C em meio Mueller Hinton.

A intensidade do laser foi ajustada de acordo com o padrão de calibração e os espectros foram adquiridos nos modos linear, MALDI(+)-TOF MS, e reflectron, MALDI(+)-TOF/TOF MS de aquisição de íon na faixa dinâmica de 2000 a 20000 Da para o modo linear. Os espectros foram adquiridos aleatoriamente em diferentes posições do *spot* por meio de movimento randômico no modo automático de aquisição do *software* FlexControl®. Os parâmetros do espectrômetro em cada modo estão listados na tabela abaixo:

Tabela 1.3. Descrição dos parâmetros utilizados na aquisição de íons para o modo linear.

Parâmetros	Modo Linear
<i>Number of shots</i>	2000
<i>Laser repetition rate</i>	1000
<i>Ion source voltage 1</i>	20 kV
<i>Ion source voltage 2</i>	18,0 kV
<i>Lens voltage</i>	8,2 kV

3.9 Processamento de dados de MALDI - TOF MS e MALDI - TOF/TOF MS

Os dados adquiridos foram processados utilizados os *softwares* flexAnalysis® versão 3.3 e MALDI Biotyper© 3.1 (Bruker Daltonics GmbH). Previamente as análises realizadas: comparação com o banco de dados de espectros

do Biotyper®, as análises de componentes principais (PCA) e matriz de índice de correlação (CCI), os espectros foram pré-processados de acordo com parâmetros padrões recomendados para cada uma dessas análises. A seguir os parâmetros de pré-processamento estão listados:

Tabela 1.4. Parâmetros utilizados no pré-processamento para identificação das bactérias, análise de componentes principais e matriz de índice de correlação.

	<i>Parameter</i>	<i>Standard</i>	<i>PCA</i>	<i>CCI</i>
<i>Mass</i>	<i>Range [Da]</i>	3000-15000	3000-15000	3000-15000
	<i>Method</i>	<i>Spectra compressing</i>	<i>Selected range</i>	<i>Selected range</i>
<i>Smoothing</i>	<i>Method</i>	<i>Savitsky-Golay</i>	<i>Savitsky-Golay</i>	<i>Savitsky-Golay</i>
	<i>Frame size [Da]</i>	25	25	25
	<i>Nº of runs</i>	2	2	2
<i>Normalization</i>	<i>Método</i>	<i>Maximum norm</i>	<i>Minimum</i>	<i>Minimum</i>
<i>Peak Picking</i>	<i>Max. Peak</i>	100	100	100
	<i>Thresold</i>	0,001	0,01	0,01
	<i>Method</i>	<i>Spectra differentiation</i>	<i>Peak fitting</i>	<i>Peak fitting</i>
	<i>Profile</i>	<i>S/N = 3</i>	<i>Gauss</i>	<i>Gauss</i>

Tabela 1.5. Parâmetros do procedimento de criação de MSP (*Main Spectra Projections*) e comparação com a biblioteca

	<i>Parameter</i>	<i>Value</i>
<i>MSP Creation</i>	<i>Max. Mass Error of Each Single Spectrum</i>	2000
	<i>Desired Mass Error for the MSP</i>	200
	<i>Desired Peak Frequency Minimum (%)</i>	25
	<i>Max. Desired Peak Number of the MSP</i>	70
<i>MSP identification</i>	<i>Frequency Threshold for Spectra Adjusting</i>	50
	<i>Frequency Threshold for Score Calculation</i>	5
	<i>Max. Mass Error of the Raw Spectrum</i>	2000
	<i>Des. Mass Tolerance of the Adjusted Spectrum</i>	250
	<i>Furthermore Accepted Mass Tolerance of Peak</i>	600
	<i>Parameter of the Intesity Correction Function</i>	0,25
<i>MSP clustering</i>	<i>Distance Measure</i>	<i>Correlation</i>
	<i>Linkage</i>	<i>Average</i>
	<i>Score Threshold Value for a Single Organism</i>	300

Tabela 1.6. Parâmetros para as análises de componentes principais (PCA) e matriz de índice de correlação (CCI).

	<i>Parameter</i>	<i>Value</i>
<i>PCA and CCI creation</i>	<i>Lower bound</i>	3000

	<i>Upper Bound</i>	15000
	<i>Resolution</i>	02-04
<i>PCA Clustering</i>	<i>Method</i>	<i>Hierarchical</i>
	<i>Distance Measure</i>	<i>Correlation</i>
	<i>Linkage Algorithm</i>	<i>Average</i>
	<i>Maximal Cluster</i>	4
<i>CCI Parameter</i>	<i>Intervals</i>	8

3.10 Análise estatística da comunidade de bactérias cultiváveis associada à *Podocarpus macrophyllus*

As comunidades de bactérias cultiváveis foram analisadas utilizando o Excel® e o software PAST® 3.16⁶³. A frequência de isolamento, riqueza e diversidade de espécies, baseada na metodologia descrita por Petrini et al.⁶⁰ e nos índices de Simpson e Shannon⁶⁴, foram determinadas para cada uma das amostras coletadas.

Os testes de Levene e Shapiro-Wilk foram aplicados para avaliar a homocedasticidade e a distribuição normal dos dados para posterior aplicação dos testes ANOVA (análise de variação) ou Kruskal-Wallis para o caso de o conjunto de dados que não apresentarem homogeneidade e/ou distribuição normal.

As composições das comunidades de bactérias cultiváveis foram comparadas segundo a estação do ano e localidade de coleta do material, utilizando as matrizes de dissimilaridade de Bray-Curtis e a análise de NMDS (*non-metric multidimensional scaling*)⁶⁵.

4 Resultados e discussões

4.1 Isolamento e análise qualitativa da variação sazonal de bactérias endofíticas associadas à *Podocarpus macrophyllus*.

A Tabela 1.7 relaciona o número total de bactérias isoladas de diferentes regiões de um indivíduo da espécie *Podocarpus macrophyllus*. Comparativamente, a região do caule apresentou maior número de isolados quando comparado a região das folhas e tal observação sugere um nível diferente de infecção das duas regiões

avaliadas. Entretanto, ao se avaliar a diferença do número de isolados com relação às estações do ano não se observa grande variação no número de isolados para uma mesma região da planta. Contudo, para se afirmar algo sobre a variação sazonal da comunidade de bactérias cultiváveis associada à planta *Podocarpus macrophyllus* é necessária a avaliação de um maior número de indivíduos e a correlação do processo de isolamento com a identificação dos gêneros e espécies que colonizam a planta^{64,65}.

Tabela 1.7. Relação de quantidade de isolados por região da planta e estação do ano.

Região	Inverno	Primavera	Verão	Outono
Folha	2	2	6	2
Caule	11	15	15	8
Fruto	-	4	4	-
Semente	-	-	-	-
Total	13	21	25	10

Como visto na Tabela 1.7, um total de 69 isolados foram coletados ao longo de 1 ano de acompanhamento de um indivíduo da espécie *Podocarpus macrophyllus*. Tal experimento teve como intuito catalogar quais os microrganismos endofíticos estão corriqueiramente presentes nesta planta, além da elaboração de uma biblioteca de “*fingerprints*” de espectros de MALDI-TOF MS.

A Figura 1.6 ilustra a composição qualitativa da comunidade de bactérias cultiváveis associada ao indivíduo. Pode-se observar que a maior variedade de gêneros ocorreu nas estações de primavera e verão, e nestas estações foram isoladas as maiores quantidades de cepas, 21 e 25 cepas respectivamente, enquanto foram isolados 13 e 10 cepas no inverno e outono.

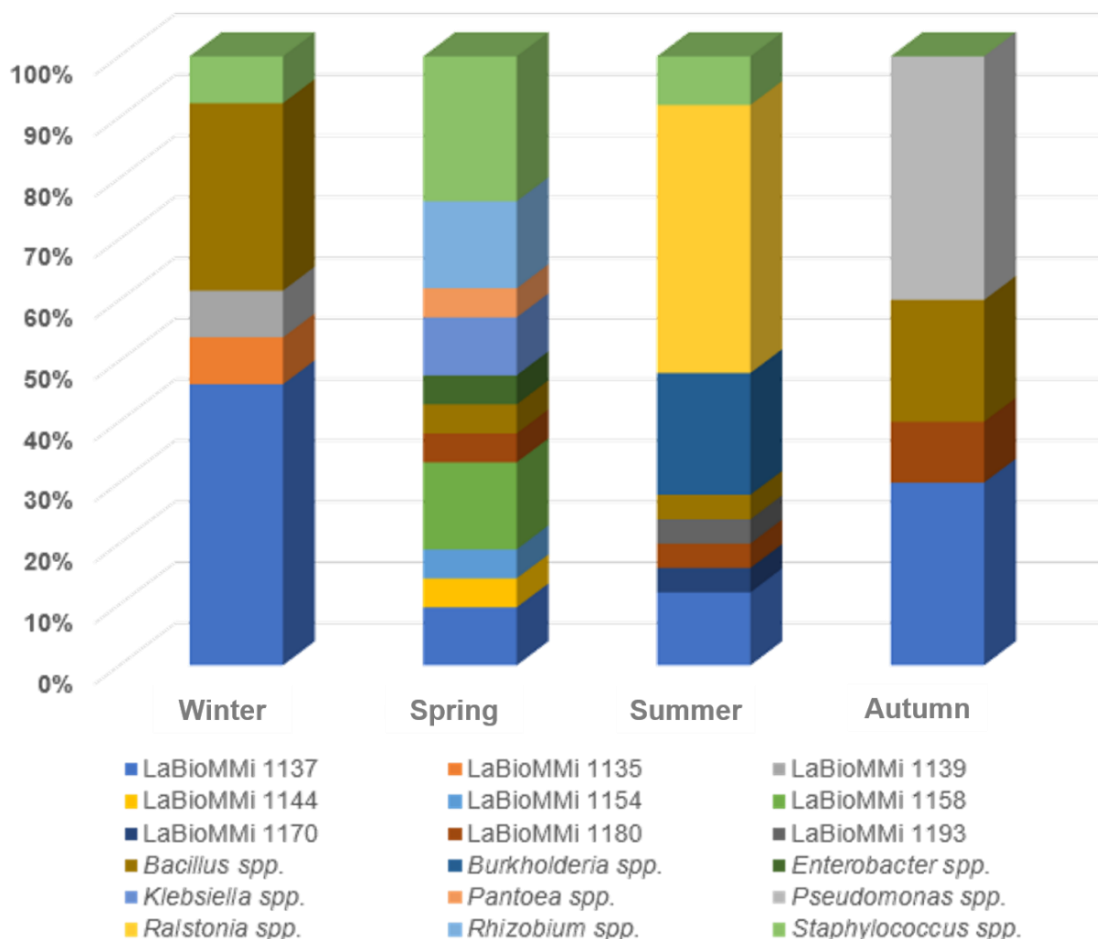


Figura 1.6. Relação de porcentagem de microrganismos isolados por estação do ano.

Observa-se que a planta é prioritariamente colonizada por bactérias do gênero *Bacillus*, *Staphylococcus* e uma bactéria não identificada cujo código atribuído a mesma foi LaBioMMi 1137, posteriormente a mesma foi identificada como *Bacillus pumilus* através do sequenciamento da região 16S rRNA. De acordo com o que pode se visualizar na Figura 1.6, tais gênero estavam presentes em todas as estações do ano nas porcentagens de 30,7 %, 4,7 %, 4,0 % e 20,0 % para *Bacillus* spp.; 7,7 %, 19,0 %, 4,0 % e 0 % para *Staphylococcus* sp. e 46,2 %, 9,5 %, 12,0 %, 30,0% para a cepa LaBioMMi 1137, respectivamente para as estações de inverno, primavera, verão e outono.

Através da identificação dos microrganismos isolados nas 4 estações é possível inferir quais destes estão intimamente associados à planta e quais podem ser oportunistas. Alguns gêneros de bactérias, aparentemente oportunistas, foram isolados no inverno: LaBioMMi 1133; na primavera: *Cupriavidus* ssp., *Klebsiella* ssp., *Pantonea* ssp., *Rhizobium* ssp.; Verão: *Arthobacter* ssp., *Burkholderia* ssp., Outono: *Pseudomonas* ssp. A

Tabela apêndice 1 do material no apêndice, relacionada a identificação dos microrganismos a partir da comparação da média de múltiplos espectros (MSP) de MALDI-TOF MS desses organismos com as bibliotecas *Bruker Taxonomy*® e LaBioMMi armazenadas no programa MALDI Biotyper® versão 3.1.

A Figura 1.7 ilustra o HCA dos espectros de *fingerprints* de MALDI-TOF MS para os microrganismos isolados. Os microrganismos puderam ser subdivididos em 8 grupos de acordo com a similaridade de seus espectros. Somente os isolados LaBioMMi 1148 e 1153 apresentaram distinção o suficiente para não se agruparem com os demais isolados. Vale destacar a proximidade dos grupos G6 e G7 que são constituídos pelas cepas similares ao LaBioMMi 1131 (*Bacillus licheniformis*) e LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*).

Como pode se observar na Figura 1.8 os espectros dessas cepas são bem similares, apresentam um padrão similar de íons. Entretanto, os marcadores 2946.490 Da, 3627.392 Da, 5894.478 Da e 7256.880 Da da cepa LaBioMMi 1131 estão deslocados em relação aos observados para a cepa LaBioMMi 1137 que são 3043.791 Da, 3621.042 Da, 6088.317 Da e 7246.505 Da.

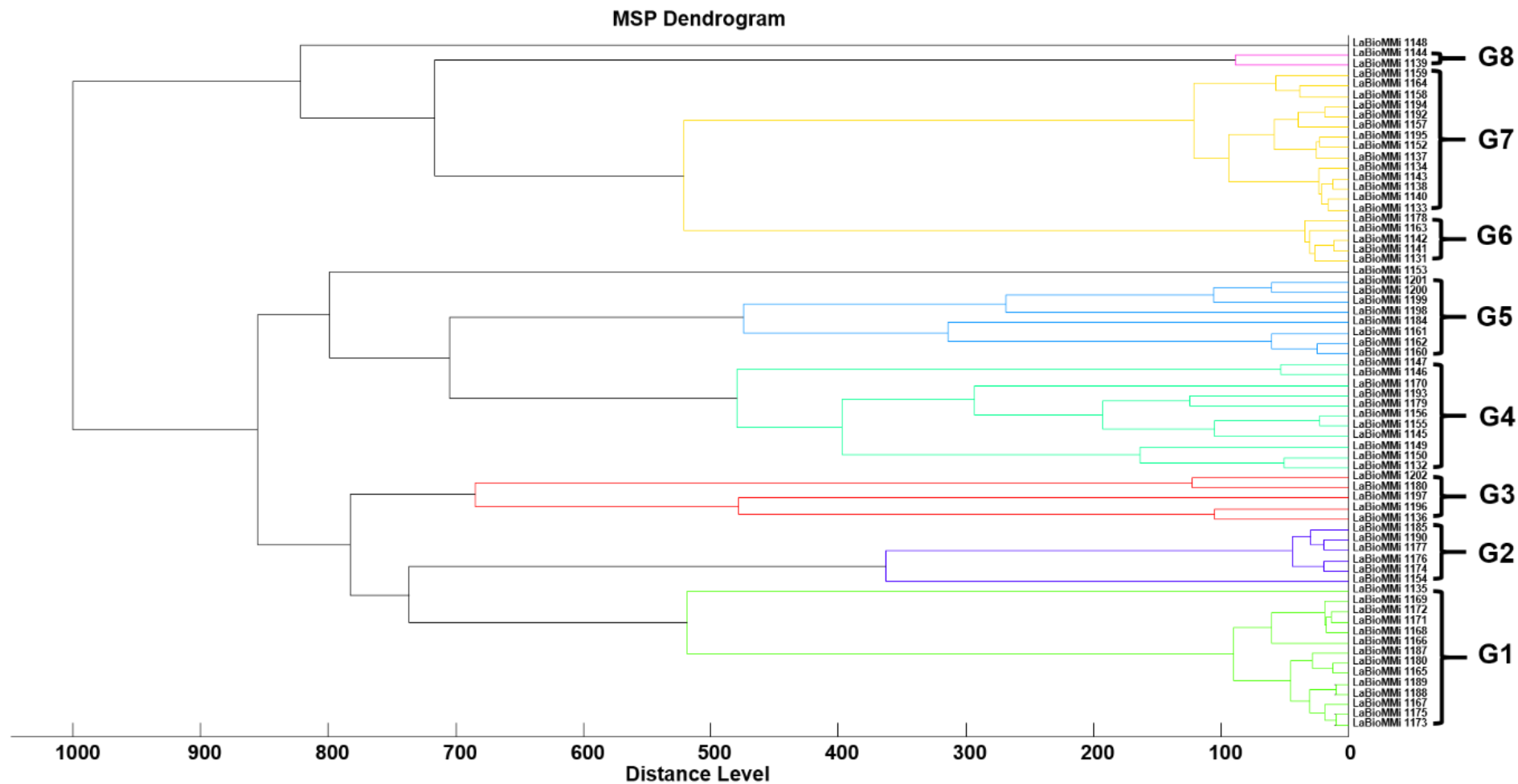


Figura 1.7. Dendrograma de MSP dos espectros de bactérias endofíticas obtido em MALDI-TOF MS na região de 2000 a 20000 Da no modo positivo de aquisição de íons.

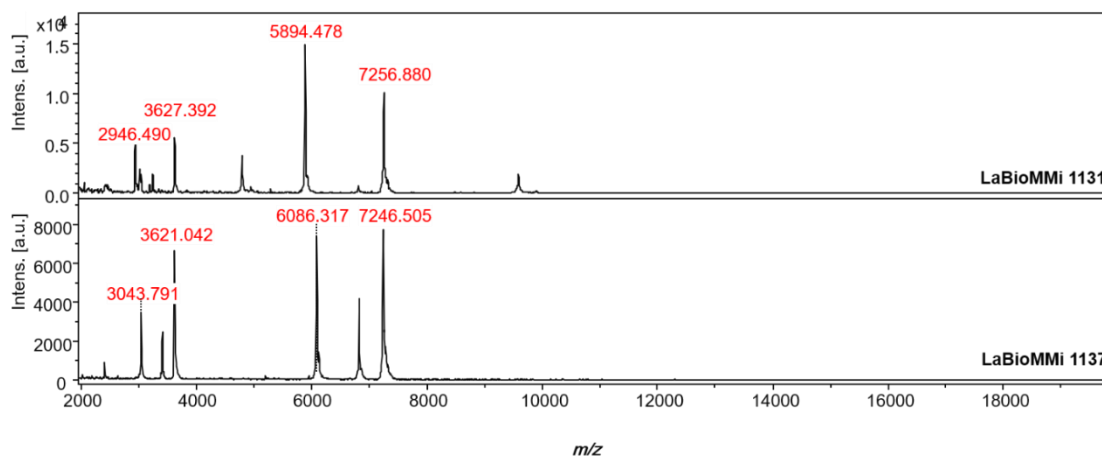


Figura 1.8. Comparação dos espectros dos isolados LaBioMMi 1131 e 1137.

A Figura 1.9 compara os *fingprints* das cepas contidas nos grupos G3 e G6. Ambos grupos são compostos por microrganismos que foram identificados pertencentes ao gênero *Bacillus*, através da comparação dos MSPs adquiridos experimentalmente com os contidos na biblioteca do software Biotyper®. Assim como nas análises de HCA, pode-se observar novamente que as cepas isoladas se dividem em dois conjuntos.

O primeiro grupo corresponde aos LaBioMMi 1131, 1141, 1142, 1163 e 1178 todos com indicação para espécie *Bacillus licheniformis*. Esse grupo demonstra alta correlação entre seus espectros, com índice de correlação variando de 0,73 entre as cepas LaBioMMi 1163 e 1178 até 0,910 para LaBioMMi 1131 e 1141.

O segundo grupo corresponde às cepas LaBioMMi 1136, 1180, 1196, 1197 e 1202. Entretanto, a correlação dos espectros dessas cepas é inferior à observada para as cepas do G6. É notável a separação do grupo G3 nos conjuntos LaBioMMi 1180 e 1202, e LaBioMMi 1196 e 1197 sendo o primeiro com correlação de 0,75 e o segundo com 0,59. Contudo, todas as cepas desse conjunto apresentam similaridade com a LaBioMMi 1136, sendo que a LaBioMMi 1196 apresenta correlação em torno de 0,81 e as demais cepas com correlação em torno de 0,64.

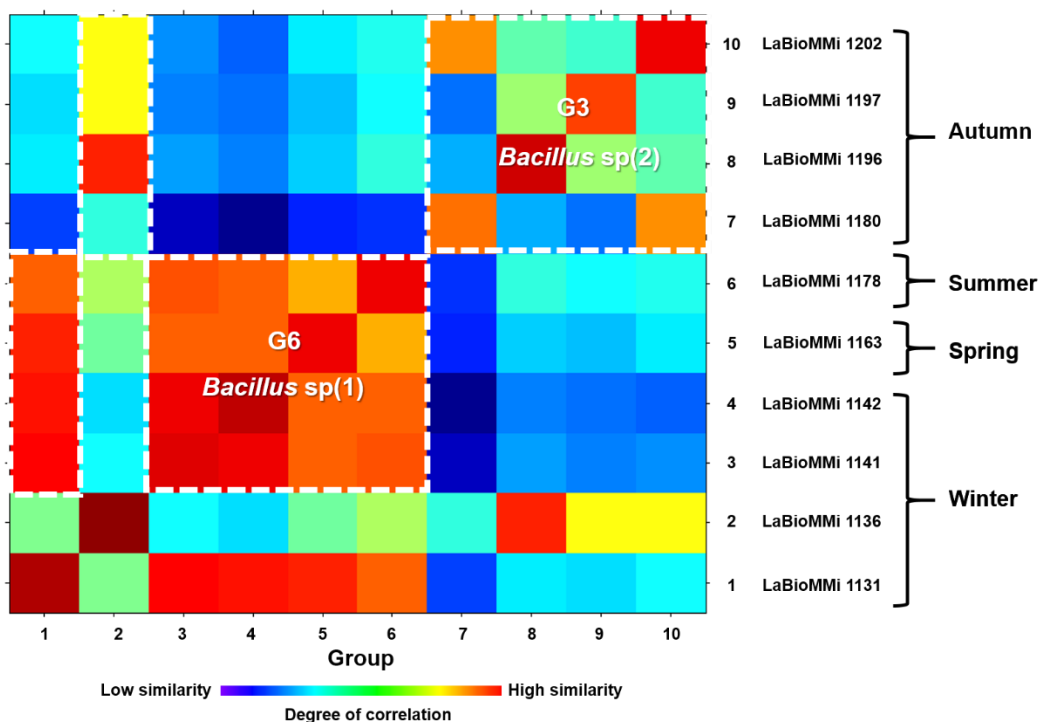


Figura 1.9. Análise de correlação entre os espectros de MALDI-TOF MS dos grupos G3 e G6 de isolados do *Podocarpus macrophyllus*.

Assim como observado para as cepas dos grupos G3 e G6, a Figura 1.10 compara os *fingerprints* das cepas contidas no G7. Novamente, o índice de correlação de seus espectros permite avaliar a similaridade dos microrganismos isolados. Os mesmos se subdividem nos agrupamentos contendo as cepas LaBioMMi 1133, 1134, 1137, 1138, 1140 e 1143 e no agrupamento das cepas LaBioMMi 1137, 1152, 1157, 1158, 1159, 1164, 1192, 1194 e 1195.

Embora seja possível a observar uma diferenciação em dois grupos, ainda há uma correlação entre esses com valor de aproximadamente 0,68. Além disso, há o fato de que ambos grupos são correlacionados à cepa LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) sugerindo que essas cepas compartilham semelhanças pontuais em seus biomarcadores.

Outro fato notável é que a LaBioMMi 1137, além de colonizar *Podocarpus macrophyllus* em todas as estações do ano, ainda foi isolado de todos os tecidos avaliados de modo que se pode inferir que essa bactéria é um microrganismo endofítico bem adaptado ao hospedeiro.

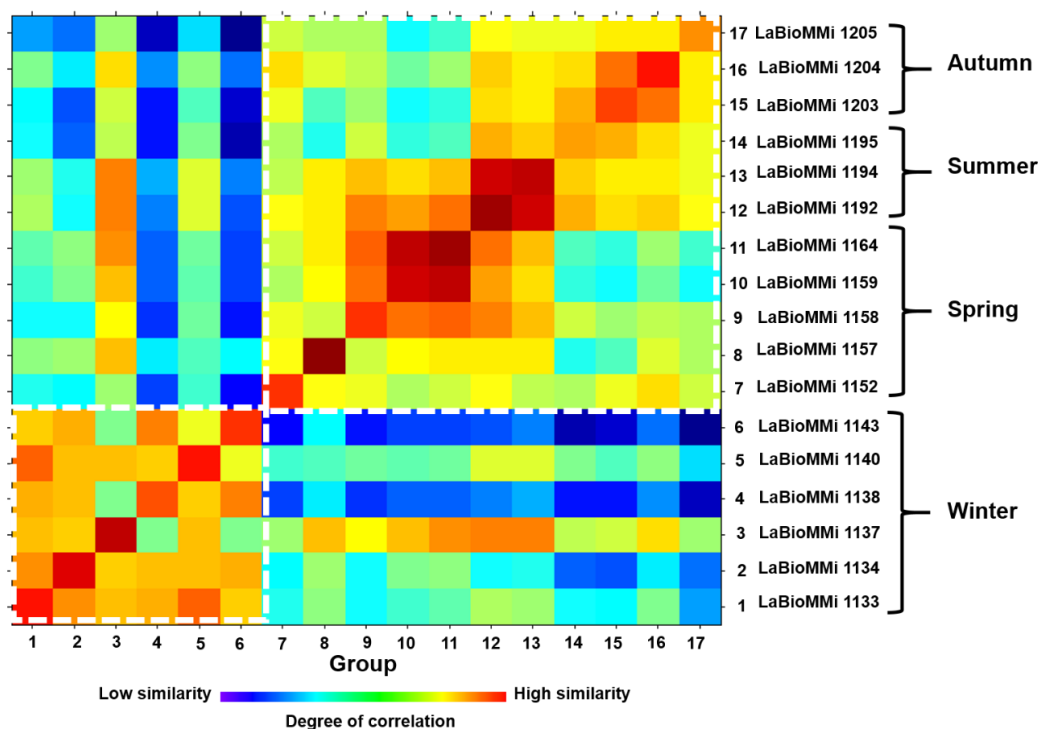


Figura 1.10. Análise de correlação entre os espectros de MALDI-TOF MS dos grupos G7 de isolados do *Podocarpus macrophyllus*.

4.2 Comparação sazonal e regional da comunidade de bactérias cultiváveis cultivável associada à *Podocarpus macrophyllus* utilizando fingerprint de MALDI-TOF MS.

Um total de 169 isolados foram coletados ao acompanhar esses indivíduos da espécie *Podocarpus macrophyllus* com o intuito de se comparar a comunidade de bactérias cultiváveis dessas plantas por meio da identificação e comparação dos *fingerprints* de espectros de MALDI-TOF MS com as bibliotecas Bruker Taxonomy® e LaBioMMi presentes no software Biotyper® 3.0.

A Figura 1.11 ilustra o HCA dos espectros de *fingerprints* de MALDI-TOF MS para os microrganismos isolados. Estes puderam ser subdivididos em 5 grupos de acordo com os microrganismos majoritários encontrados nos procedimentos de isolamento, conforme pode ser observado nas Tabela apêndice 2 do apêndice. Outros gêneros, isolados de maneira minoritária, foram distribuídos dentro desses 5 grupos segundo as suas similaridades.

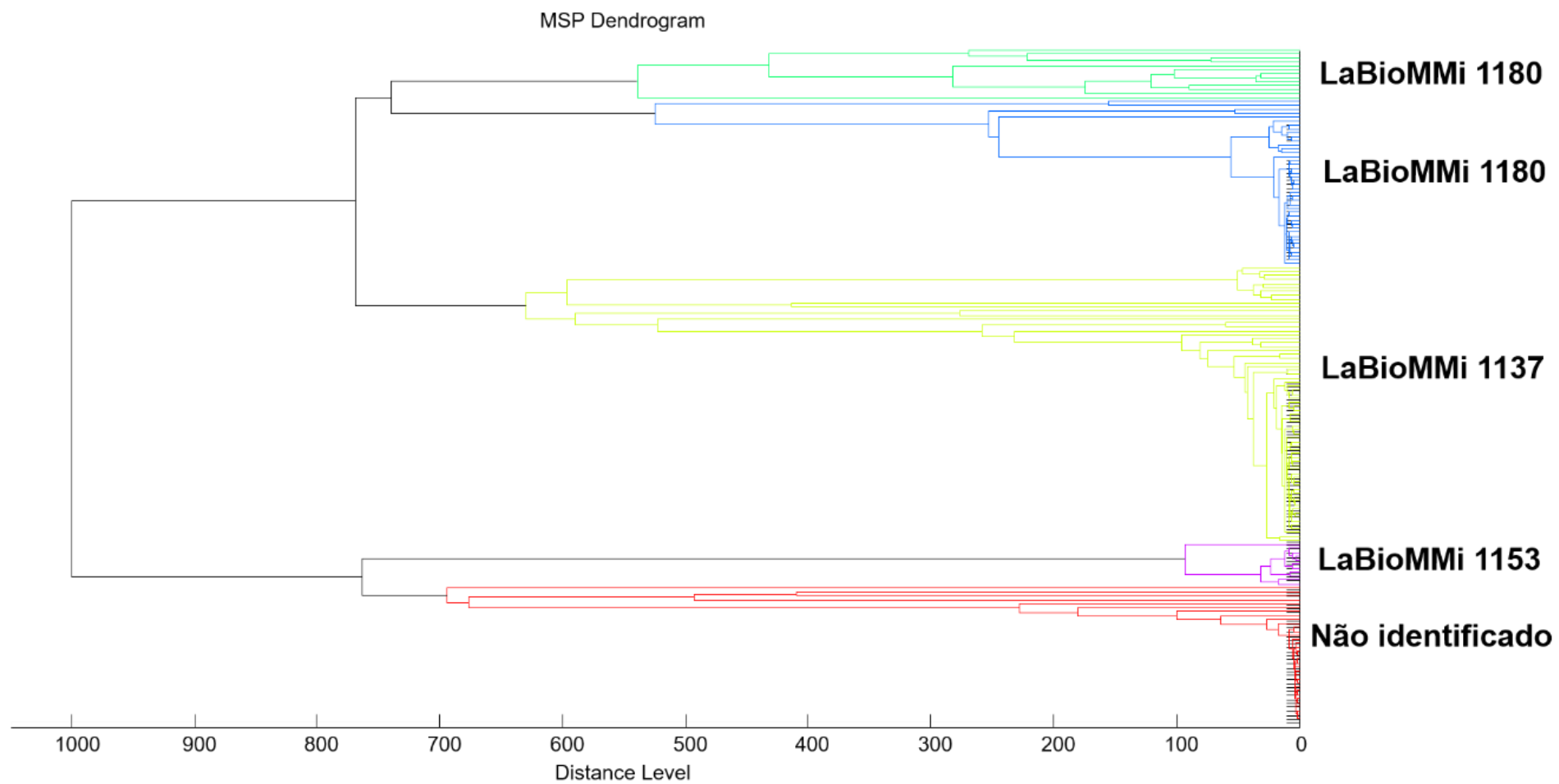


Figura 1.11. Análise de HCA dos *fingerprints* de MALDI-TOF MS dos microorganismos endofíticos isolados da *Podocarpus macrophyllus*.

As Figura 1.12 e Figura 1.13 comparam os *fingerprints* de algumas das cepas isoladas e identificadas como LaBioMMi 1137 e 1180. Os espectros dos isolados LaBioMMi 1137 (Figura 1.12) demonstram alta correlação sendo que o agrupamento relativo aos isolados da cidade de Araraquara apresentam índice de correlação acima de 0,80.

Para os isolados da cidade de São Carlos esses valores oscilaram entre 0,71 e 0,83, com exceção do número 12 que apresentou baixa correlação com os demais espectros, embora tenha sido identificado como LaBioMMi 1137. Portanto, os *scores* da Tabela 1.2, do apêndice, juntamente com o gráfico da matriz de correlação possibilitam inferir que esses isolados constituem a mesma espécie.

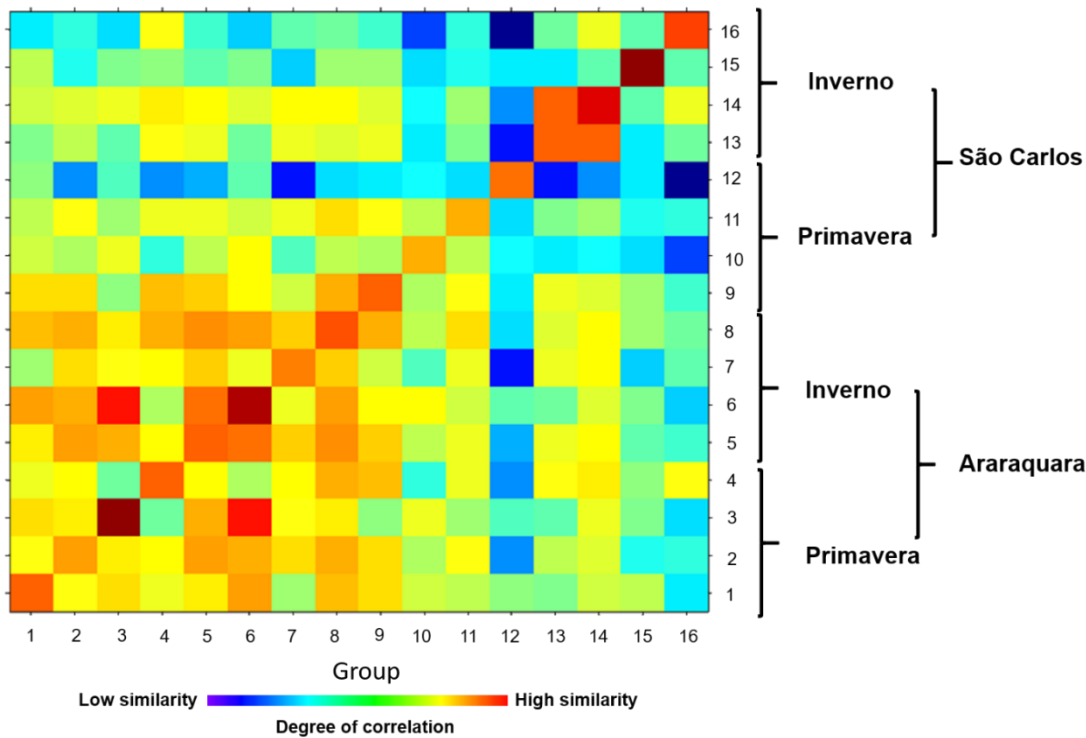


Figura 1.12. Análise de correlação entre os espectros de MALDI-TOF MS dos isolados LaBioMMi 1137 de *Podocarpus macrophyllus*.

A Figura 1.13 ilustra a análise de correlação para os espectros dos isolados LaBioMMi 1180. Novamente, observa-se alta correlação entre alguns dos isolados, os espectros de (1 a 5) e (9 a 12) demonstram alta correlação. O agrupamento relativo aos isolados da cidade de Araraquara apresentaram índice de correlação acima de 0,73 a 0,92 e tal relação também é observada para alguns isolados da cidade de São Carlos. Entretanto, os espectros numerados de 13 a 16 apresentam baixa correlação com os demais mesmo tendo sido identificados como LaBioMMi 1180.

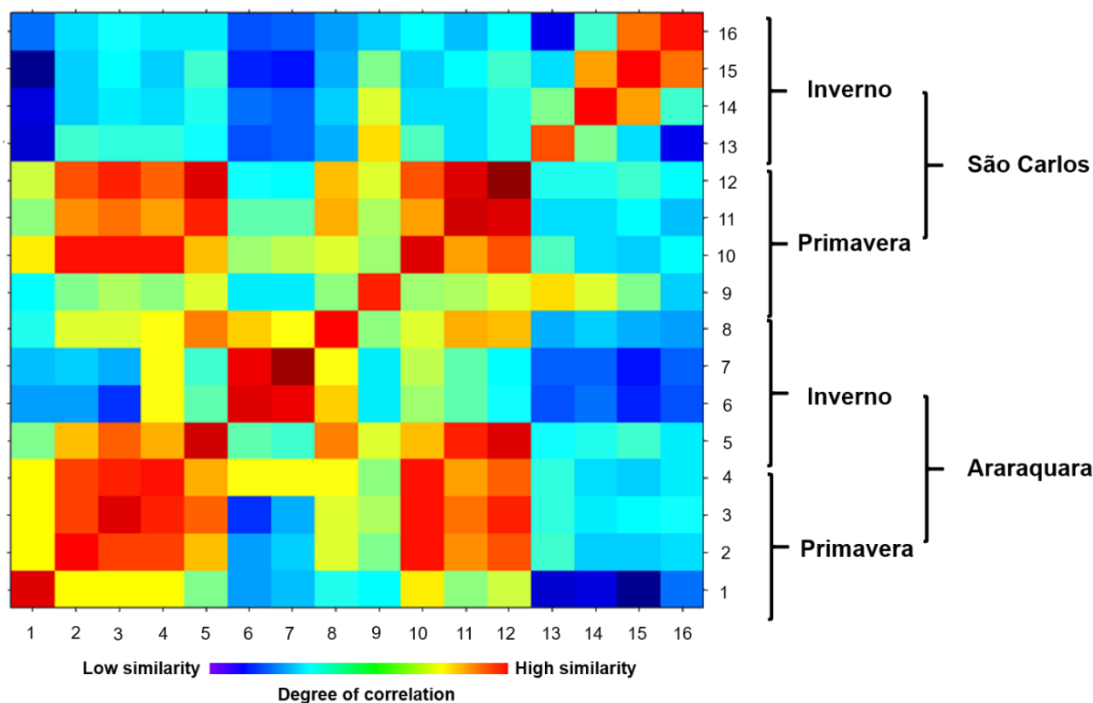


Figura 1.13. Análise de correlação entre os espectros de MALDI-TOF MS dos isolados LaBioMMi 1180 de *Podocarpus macrophyllus*.

A Tabela 1.8 ilustra as frequências de isolamento calculadas para os isolados do experimento de comparação sazonal e regional. Através dos dados de frequência é possível verificar que os isolados LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) e LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*) são os microrganismos que foram isolados nos indivíduos das todas as localidades e estações do ano avaliadas, sendo que o isolado LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) é o que apresentou maiores frequências de isolamento.

Observou-se uma alteração na composição de microrganismos quando se compara os períodos de inverno e primavera, de modo que os isolados LaBioMMi 1153 (*Enterobacter cloacae*) e um microrganismo não identificado, foram isolados no inverno. Em contrapartida, na primavera, foram isolados o LaBioMMi 1131 (*Bacillus licheniformis*), LaBioMMi 1132 (*Staphylococcus aureus*) e *Clostridium sp.*, não sendo encontrados os isolados LaBioMMi 1153 e o microrganismo não identificado.

Tabela 1.8. Frequência de isolamento e desvio padrão para cada cepa, segundo e estação do ano.

Identificação Da cepa	Inverno				Primavera			
	São Carlos		Araraquara		São Carlos		Araraquara	
	Frequência de isolamento	Desvio padrão	Frequência de isolamento	Desvio padrão	Frequência de isolamento	Desvio padrão	Frequência de isolamento	Desvio padrão
LaBioMMi 1137	18,8	7,7	39,1	17,3	25,0	7,7	26,6	13,5
LaBioMMi 1153	18,8	18,2	0,0	0,0	1,6	2,7	0,0	0,0
LaBioMMi 1180	1,6	2,7	1,6	2,7	40,6	25,2	12,5	8,8
LaBioMMi 1198	3,1	3,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
LaBioMMi 1139	3,1	5,4	1,6	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0
LaBioMMi 1158	1,6	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Não identificado	40,6	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	2,7
Dermacoccus sp.	1,6	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
LaBioMMi 1131	0,0	0,0	0,0	0,0	9,4	3,1	7,8	2,7
LaBioMMi 1132	0,0	0,0	0,0	0,0	4,7	8,1	0,0	0,0
Clostridium sp.	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	2,7	0,0	0,0

A Figura 1.14 ilustra a composição qualitativa em porcentagem da comunidade de bactérias cultiváveis associada à planta, segundo a estação do ano e localidade de coleta do material vegetal. Pode-se observar uma diferença nítida entre a composição relativa das comunidades de bactérias cultiváveis, tanto com relação à estação do ano e quanto à localidade em que o material vegetal foi coletado.

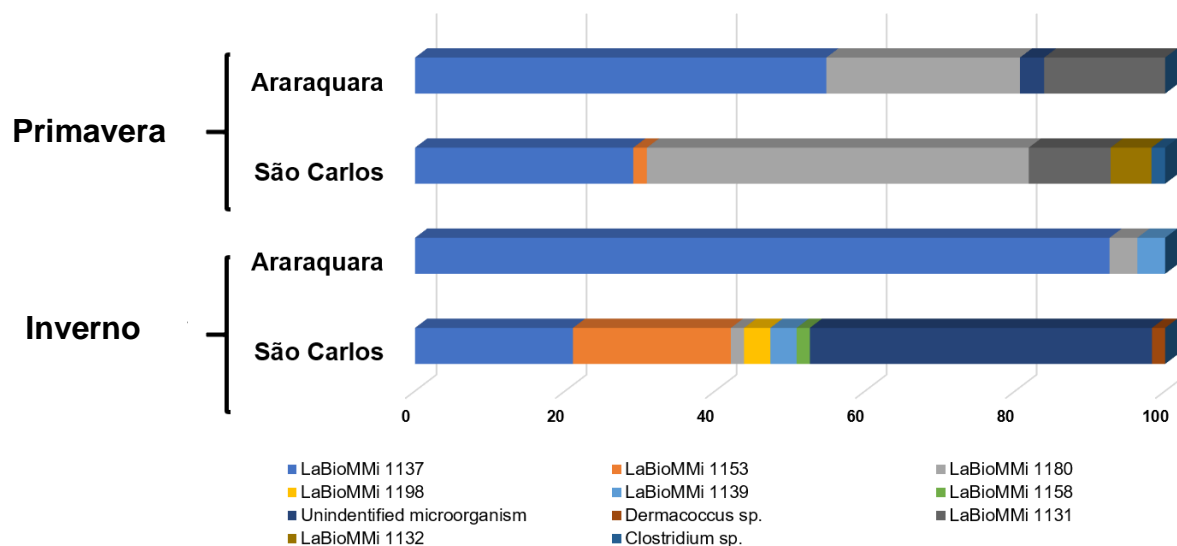


Figura 1.14. Relação de porcentagem de microrganismos isolados segundo a estação do ano e localidade de coleta.

A Tabela 1.9 ilustra os valores calculados para o teste estatístico de Shapiro-Wilk. Para todos os isolados a estatística teste é menor que o valor do tabelado para o teste de Shapiro-Wilk com 16 graus de liberdade e 95% de certeza, $W_{16}(0,95) = 0,981$.

Portanto, pode-se concluir que os isolamentos dessas cepas não seguem uma distribuição normal e conseqüentemente o teste ANOVA não pode ser aplicado para a análise estatística desses dados, haja vista que o pré-requisito de distribuição normal da população analisada não foi satisfeito.

Tabela 1.9. Valores do teste estatístico de Shapiro-Wilk para os isolados do experimento de comparação das comunidades de bactérias cultiváveis de São Carlos e Araraquara.

	LaBioMMi 1137	Enterobacter sp.	LaBioMMi 1180	LaBioMMi 1198	LaBioMMi 1139	LaBioMMi 1158
Estatística teste	0,912	0,464	0,661	0,398	0,405	0,273
	Não identificado	Dermacoccus sp.	Candida sp.	LaBioMMi 1131	LaBioMMi 1132	Clostridium sp.
Estatística teste	0,596	0,273	0,273	0,768	0,273	0,273

A Tabela 1.10 ilustra os resultados do teste de Kruskal-Wallis para a comparação das medianas relativas ao isolamento do LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) e de todos os isolados do experimento de comparação sazonal e regional da comunidade de bactérias cultiváveis associada à *Podocarpus macrophyllus*.

Aparentemente 12 gêneros distintos foram possivelmente isolados. A cepa identificada como LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) demonstra ser um microrganismo intimamente associados à *Podocarpus macrophyllus*, pois não há diferença significativa ($p > 0,05$), segundo o teste de Kruskal-Wallis, entre as medianas da contagem desses isolados nas plantas coletadas em todas as localidades e estações do ano. Por outro lado, ao se avaliar a comunidade total de bactérias, é possível verificar estatisticamente que há diferença significativa entre as comunidades, haja vista que ($p < 0,05$).

Tabela 1.10. Resultado do teste de Kruskal - Wallis relativo ao isolado LaBioMMi 1137 e da comunidade de bactérias cultiváveis total do experimento de comparação.

	LaBioMMi 1137	Comunidade total
H (chi ²)	2,553	50,28
Hc (corrigido)	2,631	78,98
p-valor	0,4521	7,97E-13

Tais relações ficam mais evidentes ao se observar os índices de Simpson e Shannon na Figura 1.15. As plantas localizadas em São Carlos, em ambas as estações, apresentam menores valores para o índice de Simpson e maiores valores para o índice de Shannon. Tal resultado demonstra que as plantas avaliadas nessa região apresentam maior variedade de espécies em sua comunidade de bactérias cultiváveis quando comparadas às plantas de Araraquara.

Além disso, ao se comparar as estações de inverno e primavera na região de Araraquara é possível observar a redução do índice de Simpson e o aumento do índice de Shannon. Essa alteração demonstra que no inverno a comunidade de bactérias cultiváveis é composta por um número reduzido de espécies e na primavera há o aumento na variedade de espécies que a compõem.

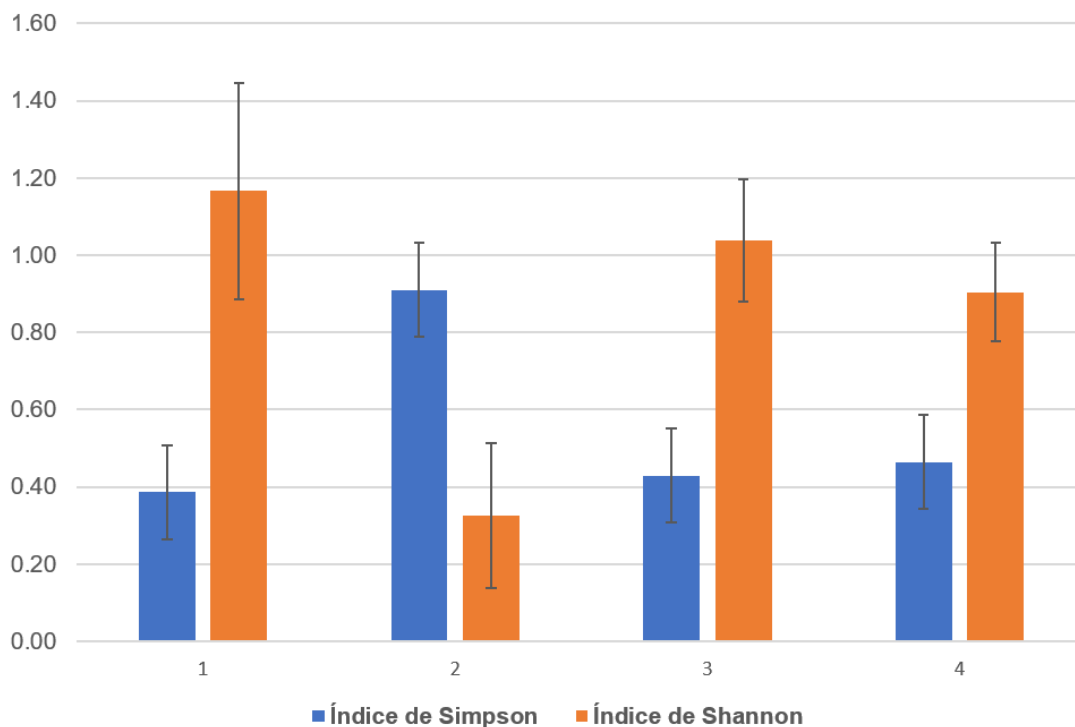


Figura 1.15. Comparação dos índices de Simpson e Shannon para as diferentes localidades e estações do ano: (1) São Carlos - inverno, (2) Araraquara - Inverno, (3) São Carlos - Primavera e (4) Araraquara - Primavera.

Os dados obtidos para avaliação de frequência, observados na Tabela 1.8, corroboram com os índices de Simpson e Shannon ilustrados na Figura 1.15, haja vista que na localidade de Araraquara no período do inverno o isolado LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) era dominante na comunidade de bactérias cultiváveis da planta com frequência de isolamento de 39,1 % e posteriormente na primavera a frequência de isolamento desse microrganismo reduziu para 26,6 %.

Além do mais, no período da primavera é observada uma maior variabilidade de microrganismos quando comparada ao período do inverno. A análise estatística para a toda comunidade de bactérias cultiváveis isolada demonstra que há diferença significativa entre a contagem total de espécies nas estações do ano e localidades analisadas ($p < 0,05$). Essa diferença pode ser confirmada pelo isolamento diferencial de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Dermacoccus*, *Enterobacter* e *Staphylococcus*, sendo algumas encontradas exclusivamente em algumas localidades e estações.

A Figura 1.16 ilustra os agrupamentos observados para o perfil da comunidade de bactérias cultiváveis dos indivíduos de *Podocarpus macrophyllus* e

evidencia bem as alterações sazonais e regionais da comunidade de bactérias cultiváveis associada à planta.

Conforme discutido anteriormente, para as análises estatísticas e os índices de Simpson e Shannon, pode-se observar que tais alterações são devidas principalmente a comunidade de bactérias cultiváveis associada as plantas localizadas na cidade de São Carlos.

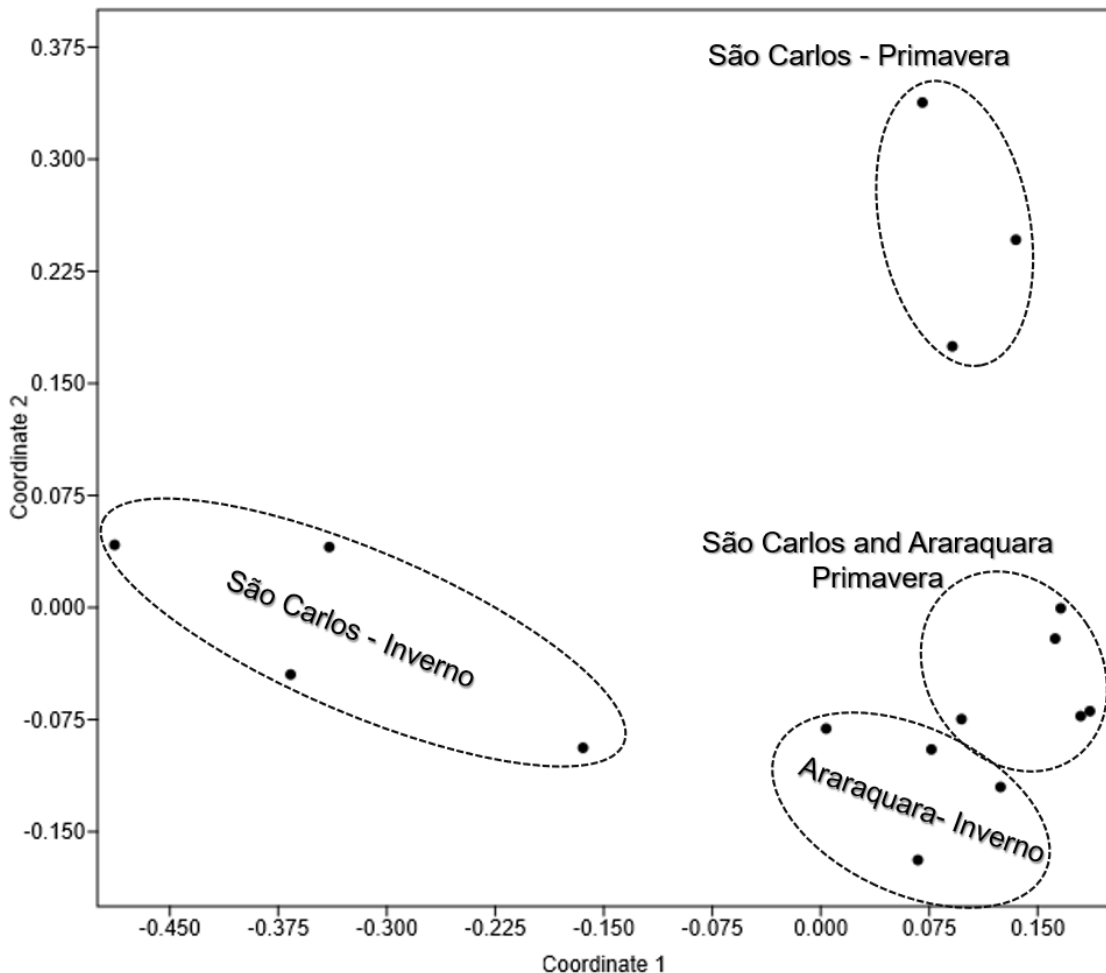


Figura 1.16. Gráfico de NMDS do perfil da comunidade de bactérias cultiváveis dos indivíduos de *Podocarpus macrophyllus* nas estações inverno e primavera, das localidades de São Carlos e Araraquara. (Stress value: 0,07)

Os agrupamentos que são relativos da localidade de Araraquara, tanto para o inverno quanto para primavera, mantêm-se bem próximos e tal resultado demonstra que a comunidade de bactérias cultiváveis dessas plantas não sofreu grande alteração, sendo composta majoritariamente pelo isolado LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) no período de inverno e pelos isolados LaBioMMi 1137 e 1180 (*Bacillus subtilis*) no período da primavera. A alteração mínima que se observa pode

ser atribuída ao isolamento de cepas similares ao LaBioMMi 1131 (*Bacillus licheniformis*) no período da primavera.

Com relação aos indivíduos da localidade de São Carlos é possível verificar o claro distanciamento dos agrupamentos. Assim como para Araraquara, o isolado LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) é um dos microrganismos majoritários da comunidade de bactérias cultiváveis das plantas da localidade de São Carlos no período do inverno e pelos isolados LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) e 1180 (*Bacillus subtilis*) no período da primavera. Entretanto, o agrupamento do inverno diferencia-se principalmente pela presença dos isolados LaBioMMi 1153 (*Enterobacter* sp.) e de um microrganismo cujo *fingerprint* não foi associado a nenhum dos microrganismos depositados tanto na biblioteca da Bruker® quanto na do LaBioMMi. Já o agrupamento da primavera distingue-se principalmente pela presença dos isolados LaBioMMi 1132 (*Staphylococcus* sp.) e *Clostridium* sp.

Ao se comparar com os resultados da literatura é possível verificar comportamentos semelhantes na alteração da composição da comunidade bacteriana associada a suas plantas hospedeiras, bem como a presença de gêneros majoritários em sua composição.

Em 2015 Shen et. al⁶⁵ avaliou a variação sazonal da comunidade de bactérias cultiváveis endofíticas de plantas de ambientes urbanos. Os microrganismos associados a *Acer negundo*, *Ulmus pumila* e *Ulmus parvifolia*, sendo gêneros identificados pertenciam aos filos Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus e Proteobacteria. Sendo que a maioria dos isolados cultiváveis pertencia ao gênero *Actinobacteria*, além desse gênero, também foram isoladas espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Frigoribacterium*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus* e *Sphingomonas*.

Em contraste com as comunidades cultiváveis, os microrganismos não cultiváveis foram representados majoritariamente por Proteobacteria e Actinobacteria, particularmente pelas espécies *Erwinia*, *Ralstonia* e *Sanguibacter* spp. Diferenças estatísticas foram observadas para as comunidades de microrganismos cultiváveis. As análises NMDS demonstraram distinção entre as amostras de *A. negundo* e *Ulmus* spp. em todas as estações.

Contudo, ao se empregar os testes ADONIS verificou-se que apenas as amostras do Inverno exibiram diferenças significativas entre a comunidade cultivável de *A. negundo* e *Ulmus spp.* Ao se analisar os dados de NMDS com relação às espécies das plantas, verificou-se que as amostras de verão se agrupam separadamente daquelas do inverno e outono.

O teste ADONIS evidenciou uma diferença significativa entre os perfis das amostras coletadas no verão em comparação com o inverno e outono para o *A. negundo* e *U. pumila*. Para a *U. parvifolia*, a comunidade bacteriana do outono era significativamente diferente das do inverno e verão.

A diversidade das bactérias endofíticas associadas a plantas do gênero *Podocarpus* é escassa, em especial as bactérias associadas ao *P. macrophyllus* são pouco conhecidas. Tendo em vista essa lacuna, plantas pertencentes a ordem *Pinales* foram utilizadas para comparação por estarem contidas na mesma ordem que o gênero *Podocarpus*. O pinheiro *P. sylvestris* é colonizado prioritariamente pelos gêneros de bactérias *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Paenibacillus*, sendo que os dois últimos gêneros também são comumente encontrados no pinheiro *P. contorta*. Entretanto, diferentemente do *P. sylvestris* e *P. contorta*, o *P. flexilis* é colonizado prioritariamente pelos gêneros *Acetobacter* e *Gluconacetobacter*.

Diante disso, em 2017, Proença et. al⁶⁶ isolaram um total de 313 bactérias endofíticas ao avaliarem pinheiros saudáveis e doentes de duas regiões distintas. As comunidades associadas aos pinheiros das regiões M e A eram compostas majoritariamente por bactérias pertencentes ao filo das Proteobactérias, compreendendo cerca de 80 a 85% dos isolados. A distribuição dentro do filo das Proteobactérias foi de cerca de 35% e 59 % de Gammaproteobacteria (Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Xantomonadaceae) para as regiões M e A respectivamente, 28% e 4 % de Betaproteobactérias para as regiões M e A respectivamente, e cerca de 20 % de Alphaproteobacteria para ambas as regiões.

Além das classes pertencentes às Proteobactérias, também foram isoladas as classes de Acidobactéria, Actinobactéria, Bacilli, e Sphingobacteria, mas com baixa frequência. Diferenças na composição da comunidade bacteriana das plantas das regiões M e A foram observadas e atribuídas a diferenças nas condições ambientais, provavelmente relacionadas à disponibilidade de água, pH e composição do solo. Além disso, a avaliação de indivíduos infectados com patógenos demonstrou

alterações na diversidade do microbioma endofítico, quando comparado ao de plantas saudáveis.

As diferenças nítidas foram observadas ao longo do avanço da doença sendo que nos estágios iniciais foram observadas pequenas alterações na diversidade bacteriana, e mudanças drásticas nos estágios mais avançados. No geral, um aumento na diversidade bacteriana foi observado nos estágios sintomáticos mais graves e que foi atribuído à perda da eficiência do sistema de defesa da planta em controlar a invasão microbiana por bactérias oportunistas e pela perda do controle do crescimento de endófitos como resultado da doença.

Em 2014 Carell et. al⁶⁷ estudaram a comunidade bacteriana associada a *P. flexilis* and *P. engelmannii*. Ao longo do estudo foi observada uma baixa variabilidade taxinômica na estrutura da comunidade endofítica das duas plantas. Os maiores filos observados foram Acidobacteria e Proteobacteria. A classe Alphaproteobacteria foi dominante em ambos os casos e a mesma era representada pelas famílias: Acetobacteraceae, Beijerinckiaceae, Caulobacteraceae, Methylobacteriaceae e Sphingomonadaceae. Devido à alta abundância relativa de alguns filotipos os autores inferiram que essas espécies sejam críticas para alguma função da comunidade microbiana e para benefício da planta hospedeira. Foi verificado que algumas espécies destas famílias são frequentemente encontradas como microrganismos endófitos de outras plantas, e as mesmas tiveram algumas funções documentadas como: fixação de N₂, produção de fitohormônios e antagonismo de patógenos.

Algumas dessas bactérias também possuem a habilidade de solubilizar fosfato. Embora esses microrganismos endofíticos possam aumentar a absorção de P pela planta, esta seria uma provável função dos microrganismos endofíticos presentes nas raízes. Portanto, é mais provável que a fixação de N₂, a proteção de patógenos ou a produção de fitohormônios fundamentem a alta abundância relativa de Acetobacteraceae dentro de *P. flexilis* e *P. engelmannii*. Haja vista que *G. diazotrofico*, *G. johanna*, *G. azotocaptans*, *Swaminathania salitolerans* são todas bactérias fixadoras de N₂.

Em 2018 Carpe et. al⁶⁸ estudaram plantas do gênero *Pinus*, em diversos estágios de maturação. As comunidades de bactérias endofíticas, das plantas adultas,

tanto de *P. flexilis* quanto de *P. contorta*, eram compostas majoritariamente de Alphaproteobacteria (83%), sendo a Acetobacteraceae dominante nessa comunidade.

Em contraste, as comunidades endofíticas das mudas dessas plantas eram dominadas por Betaproteobactérias (58%), sendo as famílias Oxalobacteraceae, Comamonadaceae e Burkholderiaceae as dominantes nessa comunidade. Essas três famílias de Betaproteobactérias também estavam presentes nas comunidades de indivíduos adultos.

Contudo, com abundância relativa muito menor quando comparadas com as mudas (1% de Oxalobacteraceae, 0,4% de Comamonadaceae e 1% de Burkholderiaceae). No estágio de brotamento, os filos dominantes foram os de Proteobacteria (85,3%) e Bacteriodetes (10,6%), e as amostras de raízes pelos filos Proteobacteria (71,2%), Bacteriodetes (15,1%) e Actinobactérias (8,9%). Nas amostras de brotos, a família Oxalobacteraceae constituía mais de metade da comunidade, em média. Já nas amostras de raiz, as famílias mais predominantes foram a Comamonadaceae (19%), Oxalobacteraceae (15%) e Burkholderiaceae (12%). Ambas as comunidades, de brotos e raízes, apresentaram proporção aproximadamente igual de Alphaproteobacteria (15 e 17%, respectivamente), com as famílias Acetobacteraceae e Sphingomonadaceae dominantes nesse caso. Além das amostras de brotos, mudas e plantas adultas, também foram avaliadas as amostras que foram submetidas ou não a irrigação.

Em todos os casos as Betaproteobacteria foram dominantes, sendo que as alterações observadas ocorreram nas partes minoritárias da comunidade bacteriana. As diferenças entre as comunidades endofíticas dos adultos e das mudas podem refletir diferentes interações funcionais com o hospedeiro e seu estágio de maturação. O grupo mais proeminente nos primeiros estágios foi o das Oxalobacteraceae, que é conhecido pela capacidade de metabolizar ácido oxálico.

A alta proporção de Oxalobacteraceae e Burkholderiaceae nas mudas podem induzir um alto teor de ácido oxálico em seus tecidos, o qual pode ser utilizado como fonte de carbono para microrganismos benéficos. Portanto, isso pode servir como estratégia de recrutamento para que microrganismos benéficos a planta venham compor sua microbiota. Alternativamente, a alta proporção de Oxalobacteraceae pode refletir alguma função benéfica como proteção contra fungos patogênicos.

4.3 Comparação entre *fingerprint* de MALDI TOF-MS de microrganismos endofíticos de diferentes plantas.

De posse das ferramentas disponíveis no pacote Biotyper® e os *fingerprints* adquiridos de diversos isolados obtidos de diferentes plantas, e catalogados na microteca do LaBioMMi, utilizamos tais ferramentas com o intuito de comparar os isolados, do mesmo gênero, de diferentes plantas na busca de correlações entre os mesmos, haja vista as limitações da biblioteca de MSPs da Bruker com relação a sua aplicação a produtos naturais.

A Tabela 1.11 lista as cepas de *Bacillus* spp., depositadas na microteca do LaBioMMi, de acordo com a planta da qual foi isolada, seu código de identificação, a região de isolamento, identificação sugerida por comparação com a biblioteca de MSPs da Bruker® e o score obtido da comparação do *fingerprint* com essa.

Tabela 1.11. Descrição das bactérias do gênero *Bacillus*, isolados de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.

Planta	Código	Região	Identificação	Score
<i>Rosmarinus officinalis</i>	LaBioMMi 421	Caule	<i>Bacillus circulans</i> DSM 11T DSM	1.477
	LaBioMMi 423	Caule	<i>Bacillus firmus</i> DSM 12T DSM	1.382
<i>Hortia</i> sp.	LaBioMMi 908	Caule	<i>Bacillus cereus</i> 994000168 LBK	2.080
<i>Podocarpus macrophyllus</i>	LaBioMMi 1131	Folha	<i>Bacillus licheniformis</i> 992000432 LBK	1.992
	LaBioMMi 1136	Caule	<i>Bacillus thuringiensis</i> DSM 2046T DSM	1.782
	LaBioMMi 1141	Caule	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13T DSM	1.997
	LaBioMMi 1142	Caule	<i>Bacillus licheniformis</i> 992000432 LBK	2.210
	LaBioMMi 1163	Caule	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13T DSM	1.632
	LaBioMMi 1178	Caule	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13T DSM	1.724
	LaBioMMi 1196	Folha	<i>Bacillus cereus</i> DSM 31T DSM	2.068
	LaBioMMi 1197	Caule	<i>Bacillus cereus</i> 994000168 LBK	1.764

A Figura 1.17 demonstra a comparação dos MSPs obtidos para cada isolado de *Bacillus* spp. É possível agrupamentos diferenciados segundo a proximidade de sinais de seus espectros. O primeiro dos agrupamentos é constituído exclusivamente de isolados provenientes do *Podocarpus macrophyllus*, sendo composto por LaBioMMi 1131, 1141, 1142, 1163, 1178. Adjacente a este é possível observada ou grande agrupamento que se subdivide em três, sendo um deles constituído exclusivamente pelos isolados oriundos do *Rosmarinus officinalis*,

LaBioMMi 421 e 423, outro composto por isolados provenientes do *Podocarpus macrophyllus* e *Hortia* sp., LaBioMMi 908, 1136 e 1197, e por fim o LaBioMMi 1196 encontra-se mais afastado dos demais.

Vale ressaltar que tais análises só fornecem inferências sobre a existência de correlações entre os sinais dos espectros desses isolados, para se avaliar o quão semelhantes e quais os sinais que diferem desses espectros será necessário utilizar-se de outras ferramentas de análise como as contidas nas Figura 1.18 e Figura 1.19 e os resultados das análises são expressos na Figura 1.20.

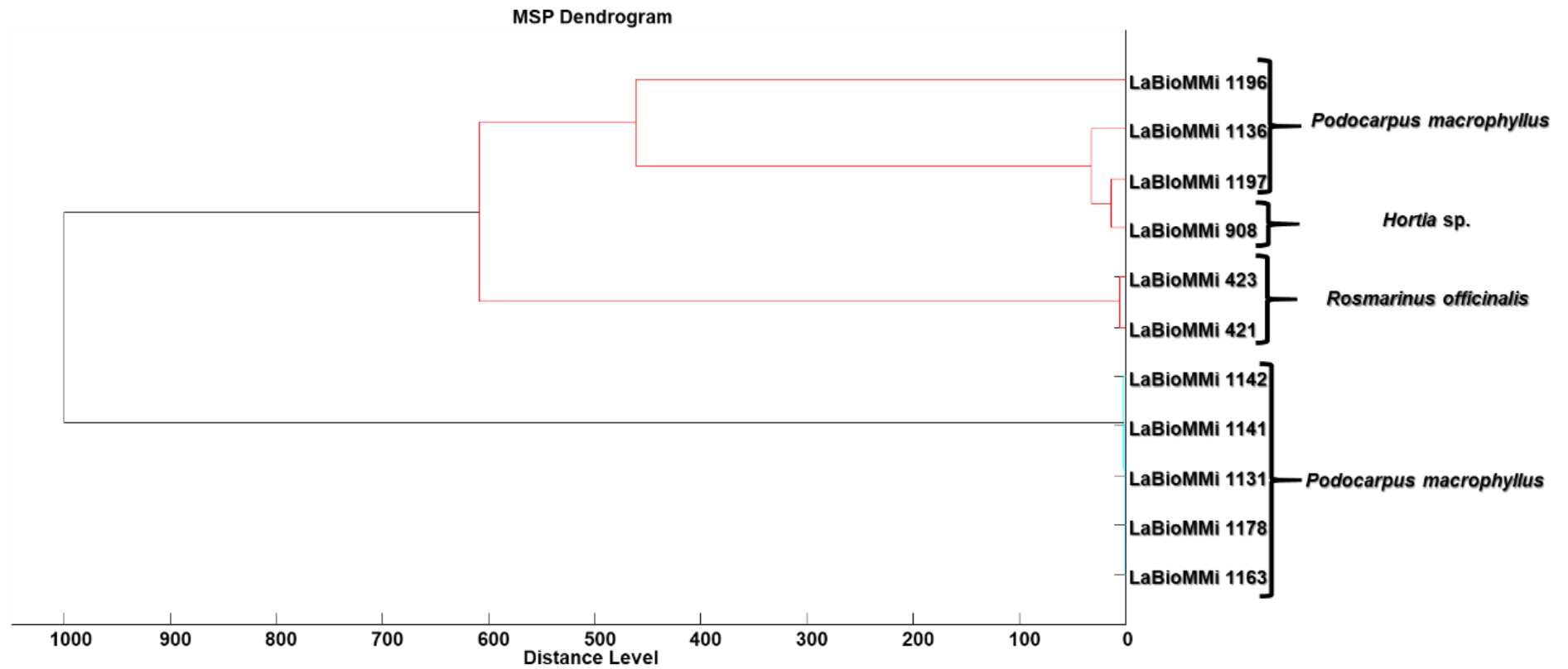


Figura 1.17 Dendrograma comparativo dos MSPs de bactérias do gênero *Bacillus*, isoladas de diferentes plantas e depositadas na microteca do LaBioMMi.

A Figura 1.18 ilustra a gráfico para o índice de correlação dos espectros de *Bacillus* spp., isolados de *Hortia* sp., *Rosmarinus officinalis* e *Podocarpus macrophyllus*. Assim como discutido anteriormente para a Figura 1.17, na Figura 1.18 os espectros também foram divididos em três grupos conforme a correlação entre os mesmos.

Os agrupamentos entre os isolados do *Rosmarinus officinalis* e os agrupamentos do *Podocarpus macrophyllus* foram novamente observados. Os espectros dos isolados do *Rosmarinus officinalis*, LaBioMMi 421 e 423, apresentam excelente correlação entre si, com valor do índice superior a 0,90. Além disso, é possível observa uma correlação baixíssima, da ordem de 0,45, do LaBioMMi 421 e 423 com o LaBioMMi 908, 1136, 1196 e 1197 indicando que há alguma similaridade ente os sinais dos espectros desses microrganismos.

Para o grupo dos isolados do *Podocarpus macrophyllus*, LaBioMMi 1131, 1141, 1142, 1163 e 1178, há uma elevada correlação, valores superiores a 0.85, entre os espectros do LaBioMMi 1131, 1141 e 1178. Para os isolados LaBioMMi 1142, 1163 e 1178 os valores do índice de correlação variam entre 0,70 a 0,80 e por fim o LaBioMMi 1131 correlaciona com esses com valores entre 0,60 a 0,75. As correlações mais baixas são dos últimos isolados da *Hortia* sp. com *Podocarpus macrophyllus*, entretanto a correlação entre os espectros apresenta valores inferiores a 0,55.

Tal gráfico, juntamente com os valores de *score* e o dendograma dos MSPs permite mensurar a similaridade dos microrganismos isolados, tratando-se da mesma espécie. De acordo com os valores de *score* o LaBioMMi 421 e 423 de espécies diferentes, mas de acordo com correlações entre seus espectros pode se inferir que se trata da mesma espécie. Confirmando os resultados de *score*, a correlação entre os espectros do LaBioMMi 1131, 1141 e 1178 confirma que se trata da mesma espécie, e aumenta a certeza que os isolados LaBioMMi 1131, 1142 e 1163 também são dessa espécie. Todavia, o valor de *score* obtido não nos dá certeza de que seja *Bacillus licheniformis*. Por fim, quanto aos isolados LaBioMMi 908, 1196 e 1197 pouco pode se inferir com relação ao nível de correlação da espécie desses isolados.

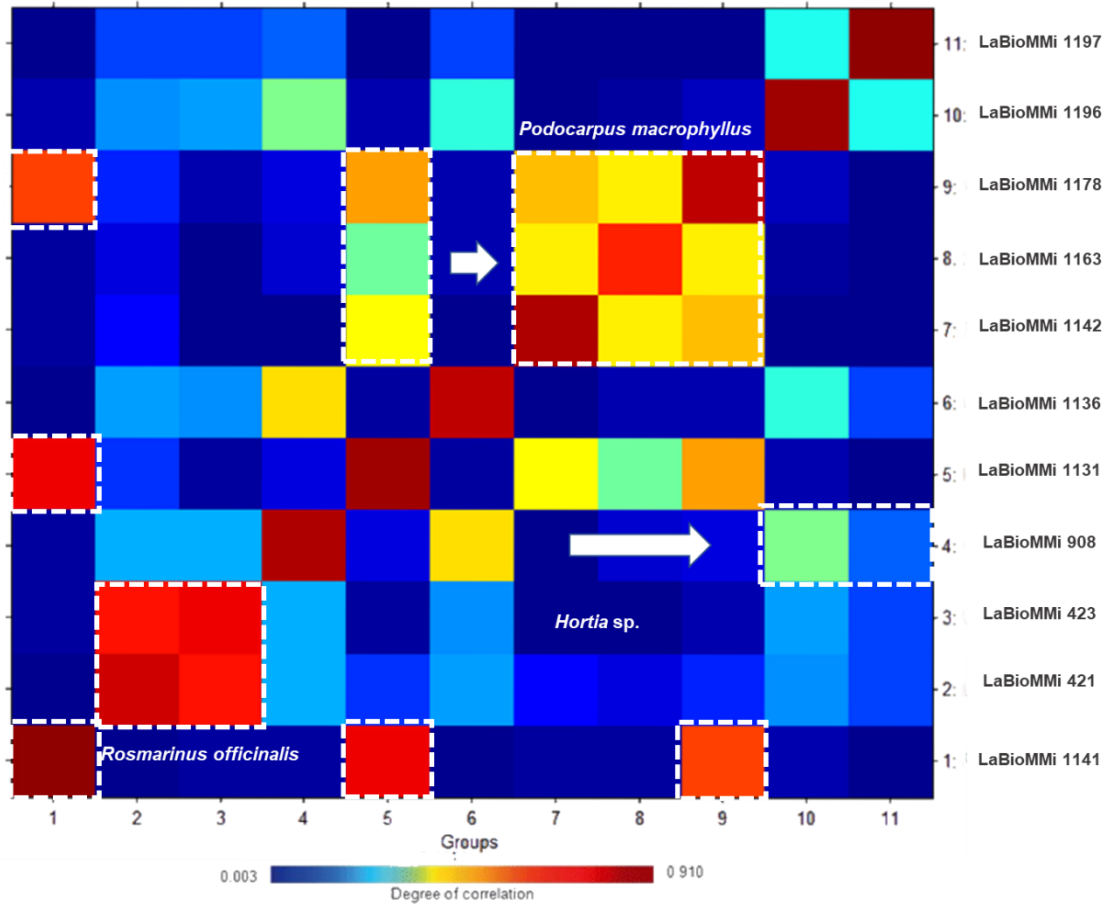


Figura 1.18. Gráfico de CCI dos MSPs de bactérias do gênero *Bacillus*, isoladas de diferentes plantas e depositadas na microteca do LaBioMMi.

A Figura 1.19 ilustra tanto os agrupamentos das cepas isoladas, obtido através do gráfico de *score* dos seus espectros, quanto o gráfico de *loadings* dos mesmos. Através de tal procedimento é possível identificar quais os sinais diferenciam os agrupamentos um dos outros, e posteriormente os marcadores característicos de cada conjunto de isolados foram assinalados e ilustrados na Figura 1.20.

O agrupamento dos isolados do *Rosmarinus officinalis*, LaBioMMi 421 e 423, e da *Hortia* sp. e *Podocarpus macrophyllus*, LaBioMMi 908, 1136 e 1196, diferenciam-se principalmente pelos sinais na região de 4320 a 4350 Da. Já o agrupamento relativo aos isolados do *Podocarpus macrophyllus*, LaBioMMi 1131, 1141, 1142, 1163 e 1178, diferencia-se por sinais nas regiões de 5880 a 5900 Da e 7250 a 7260 Da. Por fim, o LaBioMMi 1197 diferencia-se dos demais por sinais na região entre 6700 a 6800 Da.

Ainda que a separação dos microrganismos em grupos esteja boa, a variância acumulada desse modelo é aproximadamente 57%, a qual é considerada baixa. Portanto, as conclusões obtidas poderiam ser ainda melhores se uma melhor resolução de separação, agrupamentos mais nítidos e melhores correlações pudessem ser observadas.

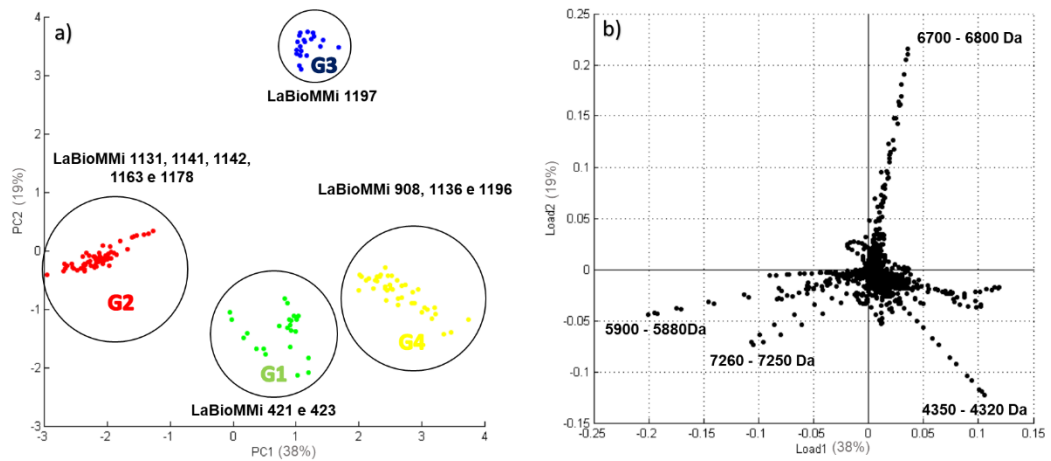


Figura 1.19. Gráfico de (a) *score* e (b) *loadings* dos MSPs de bactérias do gênero *Bacillus*, isoladas de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.

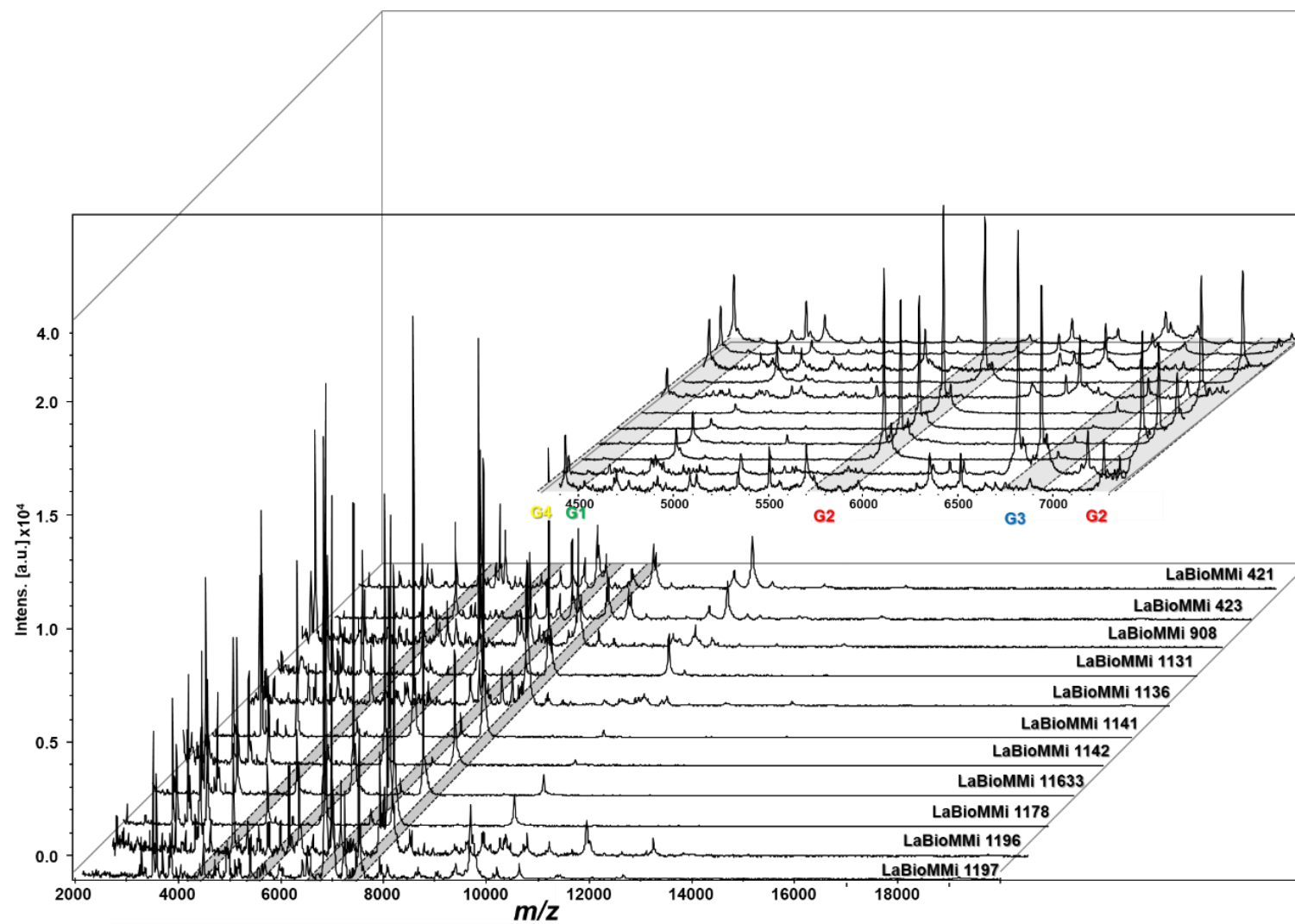


Figura 1.20. Comparação dos espectros de MALDI TOF-MS de bactérias do gênero *Bacillus*, isoladas de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.

A Tabela 1.12 lista as cepas de *Enterobacter* spp., depositadas na microteca do LaBioMMi, de acordo com a planta da qual foi isolada, seu código de identificação, a região de isolamento, identificação sugerida por comparação com a biblioteca de MSPs da Bruker e o score obtido da comparação do *fingerprint*.

Tabela 1.12. Descrição das bactérias do gênero *Enterobacter*, isoladas de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.

Planta	Código	Região	Identificação Sugerida	Score
<i>Piper aduncum</i>	LaBioMMi 420	Inflorescência	<i>Enterobacter cowanii</i> DSM 18146T DSM	1.601
<i>Salacia camerunensis</i>	LaBioMMi 896	Folha	<i>Enterobacter cloacae</i> DSM 46348 DSM	1.773
	LaBioMMi 898	Folha	<i>Enterobacter cloacae</i> MB11506 1 CHB	1.817
	LaBioMMi 900	Folha	<i>Enterobacter cloacae</i> MB11506 1 CHB	1.709
<i>Hortia</i> sp.	LaBioMMi 905	Broto	<i>Enterobacter cowanii</i> DSM 18146T DSM	1.638
	LaBioMMi 910	Caule	<i>Enterobacter aerogenes</i> 15282 1 CHB	1.914
	LaBioMMi 911	Caule	<i>Enterobacter cowanii</i> DSM 18146T DSM	1.718
	LaBioMMi 912	Caule	<i>Enterobacter cowanii</i> DSM 18146T DSM	1.736
	LaBioMMi 917	Raiz	<i>Enterobacter cloacae</i> MB11506 1 CHB	1.848
	LaBioMMi 922	Raiz	<i>Enterobacter cowanii</i> DSM 18146T DSM	1.806
<i>Podocarpus macrophyllus</i>	LaBioMMi 1153	Caule	<i>Enterobacter cloacae</i> MB11506 1 CHB	1.957

A Figura 1.21 demonstra a comparação dos MSPs obtidos para os isolados de *Enterobacter* spp. Primeiramente, observa-se o isolado LaBioMMi 1153, proveniente do *Podocarpus macrophyllus*, separado dos demais microrganismos. O primeiro dos agrupamentos a ser observado é constituído de isolados provenientes da *Salacia camerunensis* e *Hortia* sp. *Podocarpus macrophyllus*, sendo composto por LaBioMMi 896, 898, 900 e 917, sendo esses subdivididos em LaBioMMi 896 e 917 e LaBioMMi 898 e 900.

O segundo grande agrupamento é composto por isolados provenientes do *Hortia* sp. e *Piper aduncum*, compreendendo os isolados LaBioMMi 420, 905, 910, 911, 912 e 922, sendo que o LaBioMMi 910 encontra-se mais afastado dos demais.

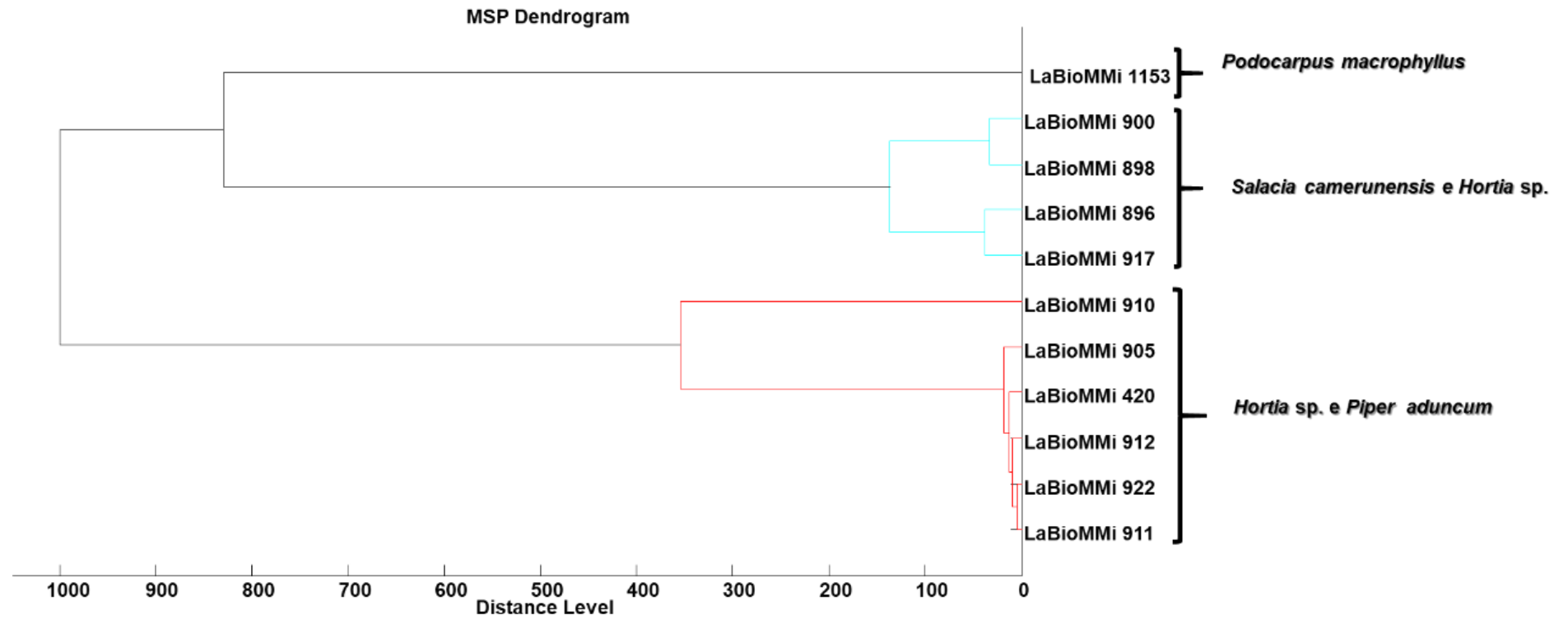


Figura 1.21. Dendrograma comparativo dos MSPs de bactérias do gênero *Enterobacter*, isoladas de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.

A Figura 1.22 ilustra a gráfico para o índice de correlação dos espectros de *Enterobacter* spp. isolados de *Hortia* sp., *Salacia camerunensis*, *Piper aduncum* e *Podocarpus macrophyllus*.

A única correlação observada é entre os isolados LaBioMMi 905, 910, 911 e 922, provenientes da *Hortia* sp., com o LaBioMMi 420, isolado da *Piper aduncum*, em todos os casos com excelente correlação com valores superiores a 0,80. A proximidade entre os sinais dos espectros dos microrganismos da *Hortia* sp. com os da *Salacia camerunensis* não foi observada nos índices de correlação.

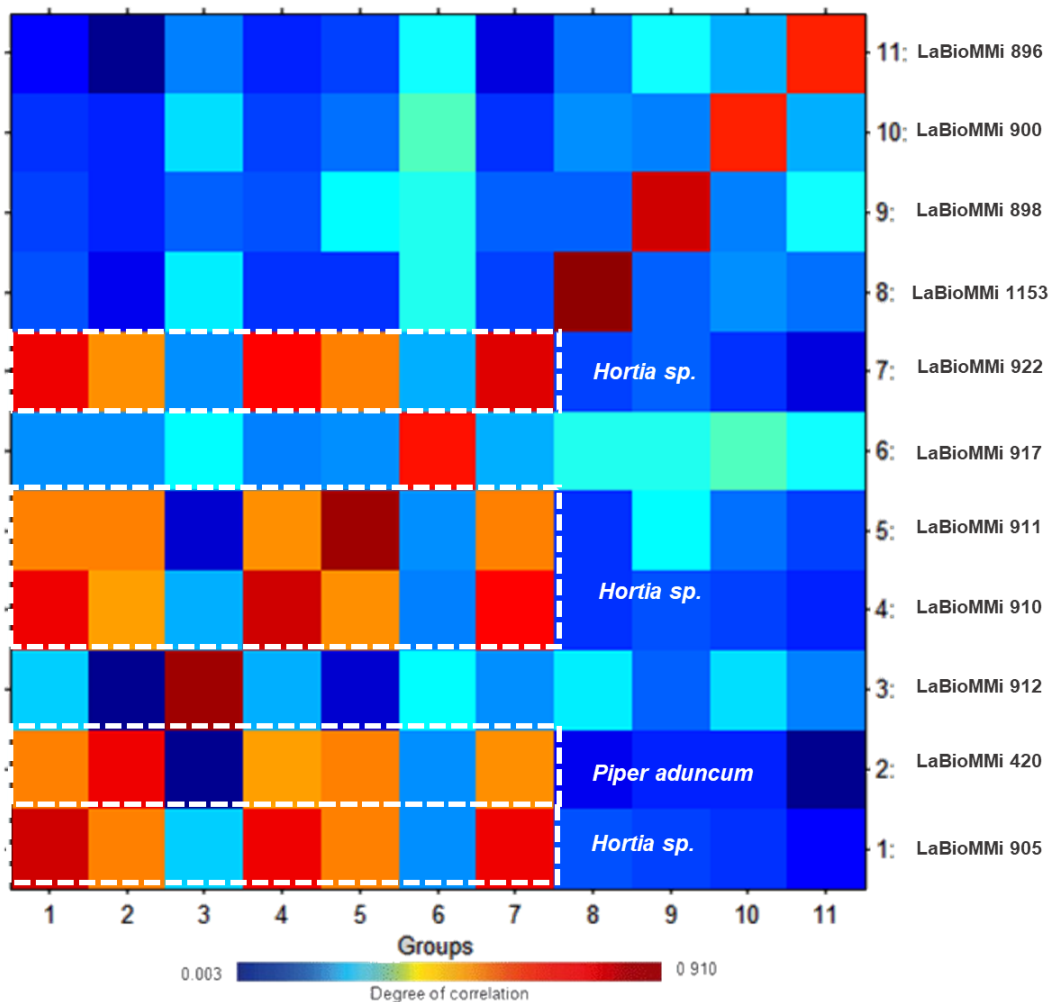


Figura 1.22. Gráfico de CCI dos MSPs de bactérias do gênero *Enterobacter*, isoladas de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.

A Figura 1.23 ilustra tanto os agrupamentos das cepas isoladas obtido através do gráfico de score dos seus espectros, quanto o gráfico de *loadings* dos mesmos. Três agrupamentos distintos podem ser observados: o primeiro (G1)

composto pelos isolados LaBioMMi 896, 898, 900 e 917, o segundo (G2) composto pelos isolados LaBioMMi 420, 905, 911, 912 e 922 e por fim o terceiro (G3) composto pelo LaBioMMi 910 e 1153.

Os dados relativos ao agrupamento (G1) encontram-se bastante dispersos, sendo influenciados por marcadores variando de 5100 a 5120 Da, 7230 a 7250 Da, 7310 a 7330 Da e 9130 a 9150 Da. Já o agrupamento (G2), relativo aos isolados do *Hortia* sp. e *Piper aduncum*, diferencia-se por marcadores na região de 6230 a 6260 Da. Por fim o (G3), LaBioMMi 910 e 1153, diferencia-se por marcadores em 7650 a 7660 Da. Embora seja possível observar a separação dos microrganismos em grupos, vale ressaltar que a variância acumulada desse modelo é aproximadamente 57%, e por tal motivo a resolução de separação e um melhor agrupamento e correlação entre os organismos não pode ser observada, haja vista que uma parte significativa dos dados não está representada nos eixos PC1, PC2 e PC3. Durante o processamento dos dados e do procedimento de “clustering” diferentes tipos de métricas e agrupamentos foram avaliados a fim de se obter a melhor separação, portanto a baixa variância acumulada nas componentes principais pode ser devido a qualidade dos espectros utilizados. A Figura 1.24 ilustra as diferenças espectrais entre os diferentes isolados.

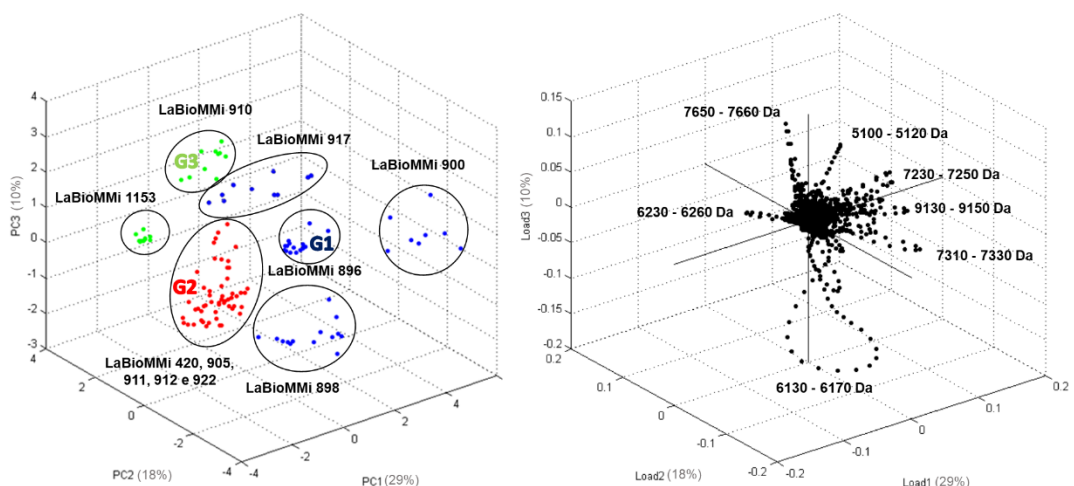


Figura 1.23. Gráfico de scores e loadings dos MSPs de bactérias do gênero *Enterobacter*, isoladas de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.

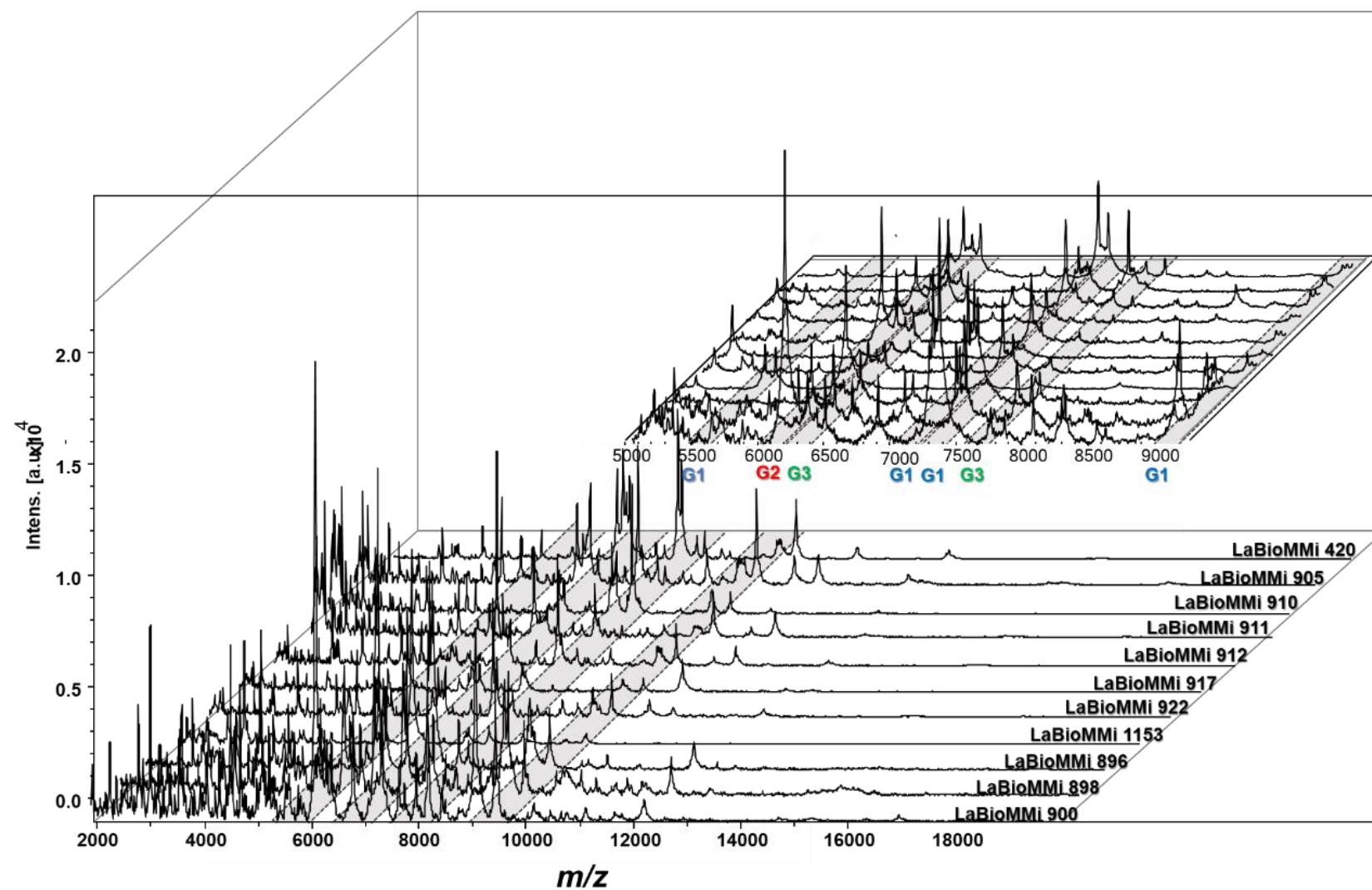


Figura 1.24. Comparação dos espectros de MALDI TOF-MS de bactérias do gênero *Enterobacter*, isoladas de diferentes plantas, depositadas na microteca do LaBioMMi.

5 Conclusões

Os processos sucessivos de isolamento de microrganismos presentes na planta *Podocarpus macrophyllus* possibilitaram a catalogação de diversas bactérias que a colonizam, ressaltando que existem poucos relatos na literatura sobre quais microrganismos colonizam esta planta. Além disso, esses isolados foram conservados e caracterizados via MALDI-TOF MS de modo que os dados relativos a eles foram adicionados tanto à microteca do LaBioMMi quanto a biblioteca de espectros de microrganismos do mesmo laboratório.

A utilização dos *fingerprints* de MALDI-TOF MS também pôde ser empregada na diferenciação de espécies de microrganismos utilizando os perfis adquiridos na região 2000 a 20000 Da e ferramentas de análise multivariada. A análise de matriz de correlação de dados possibilitou observar o agrupamento de diferentes isolados com relação à sua similaridade espectral. Tais resultados também foram visualizados nos gráficos de *scores* e com auxílio do gráfico de *loadings* foi possível determinar quais íons que podem ser utilizados como marcadores dessas espécies.

A avaliação sazonal da comunidade de bactérias cultiváveis associada à planta *Podocarpus macrophyllus* mostrou que as bactérias do gênero *Bacillus* são as que se destacam mais na comunidade, haja vista que as mesmas foram isoladas em todas as estações do ano e em todos os tecidos: LaBioMMi 1131 (*Bacillus licheniformis*), LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*), LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*), LaBioMMi 1196 (*Bacillus cereus*).

A comparação sazonal e regional de isolados de diferentes indivíduos da espécie *Podocarpus macrophyllus* demonstrou que o isolado LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) é o mais comumente isolado dessa espécie de planta de modo que se pode inferir uma boa adaptação da bactéria à sua planta hospedeira. Além disso, demonstrou-se que há alteração na comunidade de bactérias cultiváveis com relação à estação do ano e localidade na qual a planta foi cultivada.

A composição básica da comunidade de bactérias cultiváveis consistia na presença dos isolados LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) e LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*) e foi alterada principalmente pela presença dos isolados LaBioMMi 1153 (*Enterobacter cloacae*) e LaBioMMi 1132 (*Staphylococcus aureus*).

Adicionalmente, os *fingerprints* de MALDI TOF-MS juntamente com as ferramentas de análise multivariada também foram empregados na comparação das bactérias endofíticas oriundas de diferentes hospedeiros. Embora o universo amostral utilizado fosse reduzido, foi possível avaliar as relações de *Bacillus* spp. e *Enterobacter* spp. isolados de *Hortia* sp., *Piper aduncum*, *Podocarpus macrophyllus*, *Rosmarinus officinalis* e *Salacia camerunensis*.

De modo geral, as informações sobre os isolados foram inconclusivas de forma que se teve apenas indicativo ou certeza do gênero deles. Mesmo assim, a associação das ferramentas de PCA e do índice de correlação foram fundamentais para a comparação dos isolados, e aquisição de algumas informações, sem a necessidade de análises adicionais.

A partir da comparação dos *fingerprints* pode-se concluir que os isolados associados à *Hortia* sp., *Piper aduncum*, *Podocarpus macrophyllus*, *Rosmarinus officinalis* e *Salacia camerunensis* são diferentes em sua maioria. Com relação ao *Bacillus* spp. verificou-se que há maior relação entre os isolados das mesmas plantas do que o de plantas distintas, sendo alta a correlação entre o *Bacillus* sp. isolado de *Rosmarinus officinalis*, e o mesmo comportamento foi observado para *Podocarpus macrophyllus*.

Uma baixa correlação foi observada para os isolados LaBioMMi 908 e 1197, que são endófitos da *Hortia* sp. e *Podocarpus macrophyllus*. Para a *Enterobacter* spp. ficou evidente a correlação do isolado LaBioMMi 420 oriundo da *Piper aduncum* com os isolados LaBioMMi 905, 910, 911 e 922 oriundos da *Hortia* sp.

Diante disso, o equipamento de MALDI-TOF MS associado a ferramentas de análises multivariadas mostrou-se uma ferramenta rápida e versátil para a aquisição de dados relativos aos microrganismos. A comparação dos *fingerprints* adquiridos juntamente com os contidos na biblioteca do software Biotyper® possibilitou a rápida identificação de alguns dos isolados com certeza do gênero e/ou espécie.

A conciliação dos scores obtidos durante o processo de identificação, juntamente com as ferramentas de análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) e análise de matriz de correlações (CCI) possibilitaram a inferência do número de

diferentes espécies que compõem a comunidade de bactérias cultiváveis associada à *Podocarpus macrophyllus*.

A conciliação de tais ferramentas também pode ser empregada tanto nos processos de identificação, triagem de microrganismos para experimentos em larga escala, experimentos de ecologia, interação química, etc.

CAPÍTULO 2:

Avaliação do perfil de compostos fixos e voláteis produzidos por microrganismos endofíticos associados à *Podocarpus macrophyllus* e sua influência na interação entre microrganismos

1 Introdução

1.1 O gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é caracterizado por bactérias gram-positivas que apresentam forma de bastonete. Diversas características desse gênero de bactérias favorecem a sua adaptabilidade aos mais diversos nichos ecológicos, características essas como capacidade de formar endósporos, suas propriedades fisiológicas, o largo espectros de metabólitos secundários com atividade antimicrobianos (AMCs).

Dessa forma, *Bacillus* spp. são onipresentes no meio ambiente, sendo isoladas do solo, ambientes aquáticos, alimentos e microbiota intestinal de artrópodes e mamíferos, do interior de plantas, de tal forma que atualmente o gênero conta com 377 espécies catalogadas^{69,70,71}. Em termos estruturais, as células vegetativas dessas bactérias são pequenas, em média apresentam menos que 1 µm de largura, em sua maioria são constituídas por microrganismos mesofílicos e neutrofílicos. embora alguns possam tolerar pH elevado^{69,70}.

Esse gênero de bactérias é lembrado pela sua notável capacidade de produzir uma ampla variedade metabólitos secundários mediadores de antibiose. Estima-se que qualquer cepa pertencente à espécie *B. subtilis* possua ao menos 4 a 5% de seu genoma dedicado a biossíntese de compostos antimicrobianos (AMCs)⁷². Os compostos fixos produzidos por esse gênero são em geral peptídeos, geralmente cíclicos, com cadeias hidrofóbicas e contendo porções peculiares contendo aminoácidos ou ligações tioéter intramoleculares.

Além dos compostos fixos, *Bacillus* spp. também demonstram a capacidade de produzir uma enorme gama de metabólitos voláteis, com capacidade antimicrobiana ou com papéis funcionais. Os metabólitos dessas bactérias podem ser classificados quanto ao tipo da sua rota biossintética, sendo classificados como: peptídeos ribossomais (RPs) (bacteriocinas e enzimas), policetídeos (PKs), peptídeos não ribossomais (NRPs) e compostos voláteis.

1.2 Metabolitos secundários Iturina, Surfactina e Fengicina.

Dentre os compostos fixos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* destacam-se os compostos sintetizados por meio de sintetases híbridas NRPS/PKS. Tais metabólitos são compostos caracterizados por um esqueleto de policetideo

contendo aminoácidos incorporados, no caso de um híbrido de PKS-NRPS, ou de uma cadeia peptídica contendo um grupo cetona característico de um híbrido NRPS-PKS. Dentre os metabólitos relatados na literatura como produtos do metabolismo secundário de bactérias do gênero *Bacillus* as três famílias de lipopeptídeos cíclicos, surfactina, iturina (iturinas, micosubtilisinas e bacilomicinas) e fengicina, são as mais comumente relatadas (Figura 2.1).

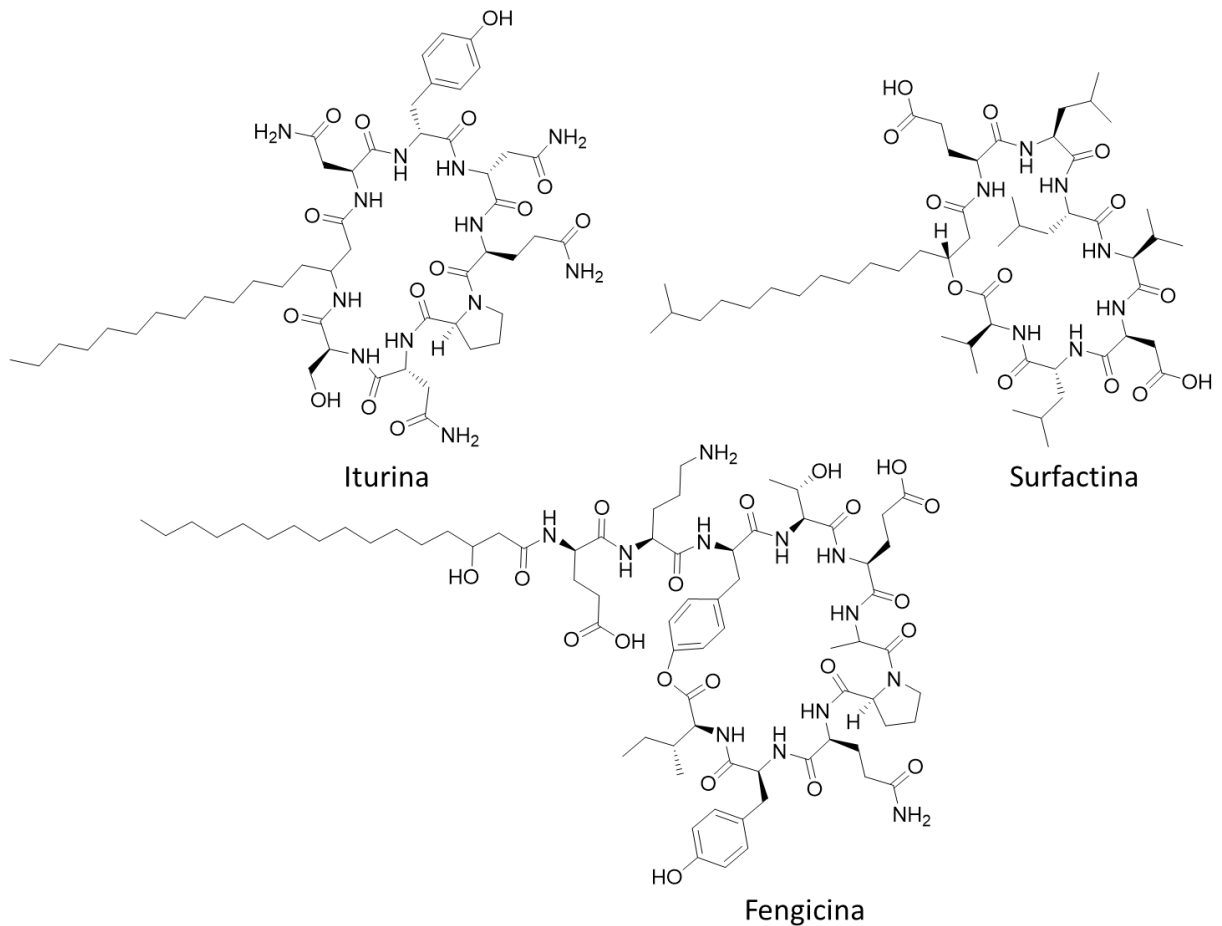


Figura 2.1. Ilustração estrutural dos metabólitos Iturina, Surfactina e Fengicina.

Tais famílias de metabólitos subdividem-se quanto a diferenças na sua composição de aminoácidos e no número de átomos de carbono que compõem a cadeia lipídica⁷³⁻⁷⁶. A família de lipo-heptapeptídeos Iturina, é caracterizada pela presença dos resíduos de aminoácidos distribuídos na sequência quiral N—L-Asn—D-Tyr—D-Asn—L-Gln—L-Pro—D-Asn—L-Ser—C, ciclizados por uma ligação amida com um ácido graxo β-amino, que é componente lipofílico da molécula. A cadeias carbônicas da porção lipofílica da molécula podem variar entre 13 a 17 átomos de

carbono⁷³⁻⁷⁶. Os compostos de iturina apresentam 6 isoformas predominantes, as Iturinas A e C, Micosubtilisina e as Bacilomicinas D, F e L.

Outro metabólito clássico é a surfactina, esse composto também é um heptapeptídeo cuja porção é composta de 12 a 16 átomos de carbono, sendo o principal componente mais comum dessa porção lipofílica o ácido 3-hidróxi-13-metil-tetradecanóico. Já a porção peptídica da molécula é composta pela a sequência dos resíduos dos aminoácidos N—L-Glu—L-Leu—D-Leu—L-Val—L-Asp—D-Leu—L-Leu—C.

A Surfactina pode variar em suas isoformas com relação ao aminoácido presente na sétima posição, variando entre as isoformas Surfactina A, que contém o aminoácido Leucina, e Surfactina B que contém Valina. Essas alterações de aminoácidos são dependentes da linhagem, das condições de cultivo e nutricionais em que o microrganismo se desenvolveu^{75,76}.

Por fim, a fengicina difere em duas principais isoformas, sendo elas a Fengicina A cuja sequência de resíduos de aminoácidos é L-Glu—D-Orn—D-Tyr—D-allo-Thr—L-Glu—D-Ala—L-Pro—L-Gln—L-Tyr—L-Ile, enquanto que na Fengicina B, o resíduo de aminoácido referente à D-Ala é substituído por D-Val. A molécula é ciclizada por meio de uma ligação lactona entre os resíduos dos aminoácidos D-Tyr e L-Ile. A estrutura final é composta pela ligação de um ácido graxo β -hidróxi ligado a uma porção peptídica de 10 aminoácidos, aos quais inclui-se o ciclo de 8 aminoácidos. A cadeia carbônica desse ácido graxo é composta por 13 a 18 átomos de carbono, podendo ser saturado ou insaturado. Todas as famílias desses metabolitos possuem potente atividade antimicrobiana⁷³⁻⁷⁷.

1.3 Compostos voláteis produzidos por *Bacillus* spp.

A produção de compostos voláteis por *Bacillus* spp. leva tanto à excreção de compostos voláteis inorgânicos quanto orgânicos, sendo alguns desses subprodutos derivados do metabolismo primário do microrganismo, como por exemplo: compostos carbonatados, hidrogenados, sulfurosos ou nitrogenados, como CO₂, CO, H₂, HCN, H₂S, N₂, NH₃ e NO.

Compostos contendo nitrogênio são excretados por bactérias desnitrificantes localizadas em camadas superiores de sedimentos aerados. Em

ambientes pouco oxigenados, tais microrganismos tendem a produzir voláteis como H₂ ou H₂S. Tais compostos podem atuar como aceptores de elétrons, precursores de aminoácidos ou metabólitos antimicrobianos. O sulfeto de hidrogênio, por exemplo, pode ser produzido por *B. subtilis* a partir de redução de sulfato por meio do catabolismo de L-metionina e L-cisteína, por meio da clivagem direta de L-metionina ou uma transaminação seguida de desmetilação^{78,79}.

Em contrapartida, os compostos orgânicos voláteis em geral possuem menos que 20 átomos de carbono e baixa massa molecular, em torno de 100–500 Da, alta pressão de vapor, baixo ponto de ebulição e uma porção lipofílica. São constituídos por uma ampla variedade de ácidos graxos e seus derivados. Tamaña é sua importância que os mesmos representam até 87%, de todo o conteúdo de compostos orgânicos voláteis catalogados para a bactéria *B. subtilis*. Dentre a variedade de compostos voláteis pode-se citar a produção de alcanos, alcenos, alcinos, ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos, ésteres, furanos, cetonas, lactonas, benzenoides⁷⁸.

Outra importante classe de compostos voláteis encontrada em bactérias do gênero *Bacillus* são os Terpenos. Estes metabólitos secundários estão entre os mais abundantes encontrados em seres vivos, possuem atualmente mais de 72000 compostos subdivididos em 370 tipos. A classe dos terpenos, juntamente com a de esteroides e carotenoides compreendem aproximadamente um terço de todo o conteúdo do “The Dicionary of Natural Products”^{80,81}.

Bactérias do gênero *Bacillus* são grandes candidatas a microrganismos produtores de compostos terpenóides, haja vista que o *Bacillus subtilis* em comparação com outros microrganismos possui mais genes e proteínas relacionados à rota biossintética de terpenoides, e adicionalmente foi demonstrado que *B. subtilis* possui uma elevada taxa de produção de isopreno⁸².

Composto nitrogenados distinguem-se entre compostos acíclicos e cíclicos. Dentro do primeiro grupo, os compostos nitrogenados são subdivididos em três grupos contendo amidas, amins e iminas. Enquanto para os cíclicos, existem cinco subdivisões de compostos: azóis, pirazinas, piridinas, piridazinas e pirimidinas⁸³.

Dentre os compostos voláteis contendo enxofre em sua estrutura, o dimetil dissulfeto (DMDS), dimetil trissulfeto (DMTS), S-metil tioacetato ou S-metil

butanotioato foram identificados no perfil de compostos voláteis de *Bacillus subtilis* e os mesmos apresentam atividades antifúngica e nematicida, além de afetar a comunicação de células bacterinas, uma vez que o DMDS diminui a quantidade de N-acil homoserina lactona (AHL), um mediador de *quorum sensing*⁸⁴⁻⁸⁷.

1.4 O papel dos metabólitos secundários na interação entre microrganismos, e microrganismos e planta hospedeira

1.4.1 Interação entre bactérias e outros microrganismos

Os compostos orgânicos voláteis (VOCs) são metabólitos cujo foco dos estudos está corriqueiramente associado ao efeito dos compostos emitidos por um microrganismo sobre outro. Entretanto, esses metabólitos vêm sendo reconhecidos recentemente devido ao seu importante papel tanto na comunicação entre microrganismos quanto aos seus aspectos envolvidos na regulação da interação entre microrganismos-microrganismos e microrganismos-plantas hospedeiras. Como exemplos desses comportamentos pode-se citar: interação de longa distância na comunidade microbiótica; regulação da dinâmica populacional da comunidade; regulação da expressão genética; interferência na competição, supressão ou eliminação de potenciais inimigos⁸⁸⁻⁹¹.

A produção do sesquiterpeno cariofileno por bactérias ectosibiontes ao fungo *Fusarium oxysporum* afetaram a patogenicidade desse fungo. Em presença das bactérias e da produção do sesquiterpeno, dois genes relacionados à patogenicidade desse fungo apresentaram sua expressão reprimida. Quando cultivado sem as bactérias ectosibiontes, e a consequente ausência do sesquiterpeno, o fungo tornava-se patogênico⁹².

A produção da albaflavenona foi identificada em cepa de *S. albidoflavus* e *S. avermitilis*. A avaliação desse metabólito demonstrou que a mesma possui atividade antibacteriana^{93,94}. As cepas de *S. albus* e *S. lividans* produzem diversos terpenos e dentre esses o diidro- β -agarofurano apresenta atividade antibacteriana⁹⁵. O mecanismo pelo qual ocorre a atividade antibiótica dos compostos voláteis ainda não é bem conhecido.

Contudo, acredita-se que o mesmo está relacionado com a hidrofobicidade desses compostos e a capacidade dos mesmos de se particionarem na camada lipídica da membrana celular alterando a permeabilidade da mesma. Tais resultados são reforçados pela alteração da permeabilidade seletiva da membrana celular de *Staphylococcus aureus* e *E. coli* quando expostas ao acetato de linalila, (+)-mentol e timol⁹⁶.

A bactéria *Collimonas fungivorans*, que apresenta a habilidade tanto de colonizar quanto de crescer nas hifas de fungos, fenômeno descrito como micofagia, produz uma gama de compostos voláteis que atuam à longa distância e apresentam o papel de atrair outras bactérias micofágicas⁹⁷. Outros exemplos de interação entre microrganismos são *Pseudomonas fluorescens* e *Serratia plymuthica* que emitem voláteis com efeitos bacteriostáticos contra as bactérias patogênicas *Agrobacterium tumefaciens* e *A. vitis* inibindo o crescimento desses patógenos nas plantas hospedeiras.

Compostos voláteis podem induzir a uma série de respostas fenotípicas na interação com outras bactérias ou fungos. As respostas podem afetar significativamente a taxa de crescimento, atividade antimicrobiana, formação de biofilme e alterações na mobilidade. A regulação da emissão de compostos voláteis pode ser uma das vias de regulação de respostas dos microrganismos presentes na comunidade microbiótica.

Estudos demonstraram uma relação interdependente da concentração dos voláteis com o efeito sobre a mobilidade bacteriana, de modo que a manipulação do gradiente de voláteis pode favorecer interações mutualísticas através da atração de microrganismos compatíveis e repulsão de microrganismos concorrentes do mesmo nicho ecológico^{91,98,99,100}.

1.4.2 Interação entre bactérias e plantas

Fatores abióticos provocadores de estresse ambiental, como: seca, salinidade, contaminação por metais pesados, inundações, temperatura e incidência de radiação ultravioleta são importantes moduladores no desenvolvimento das plantas.

A síntese e excreção de fitormônios têm um papel importante na mitigação dos efeitos do estresse abiótico, bem como no metabolismo da planta^{101,102,103}. Entretanto, essas pressões ambientais podem alterar os níveis do fitormônio nas plantas causando perturbações no crescimento das mesmas.

Tais efeitos podem ser minimizados ou até mesmo suprimidos pela presença de microrganismos que colonizam a região da rizosfera ou associados endofiticamente aos tecidos da planta, de forma que essa associação pode trazer diversos benefícios para a planta através da produção de diversos metabólitos bioativos⁸⁸.

Essas são conhecidas como bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPB) e podem estimular seus hospedeiros através de diversos mecanismos, dentre os quais os mais importantes são a produção de fitormônios e a indução da síntese de compostos de defesa contra patógenos. Diferentes gêneros podem compor a microbiota associada, podendo destacar *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bulkholderia*, *Gluconoacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*⁸⁸.

Os benefícios produzidos pelas PGPB estão relacionados à biossíntese de diversos reguladores de crescimento, como: auxinas (IAA), giberilinas (GB), citoquininas (CK), ácido abscísico (ABA). Esses metabólitos regulam a concentração de hormônios nos tecidos das plantas e seus efeitos são similares aos obtidos com a aplicação externa de fitormônios^{104,105}. A Figura 2.2 ilustra como ocorre a interação entre a microbiota endofítica presente na rizosfera e a planta, assim como os benefícios que a biossíntese dos fitormônios pode propiciar.

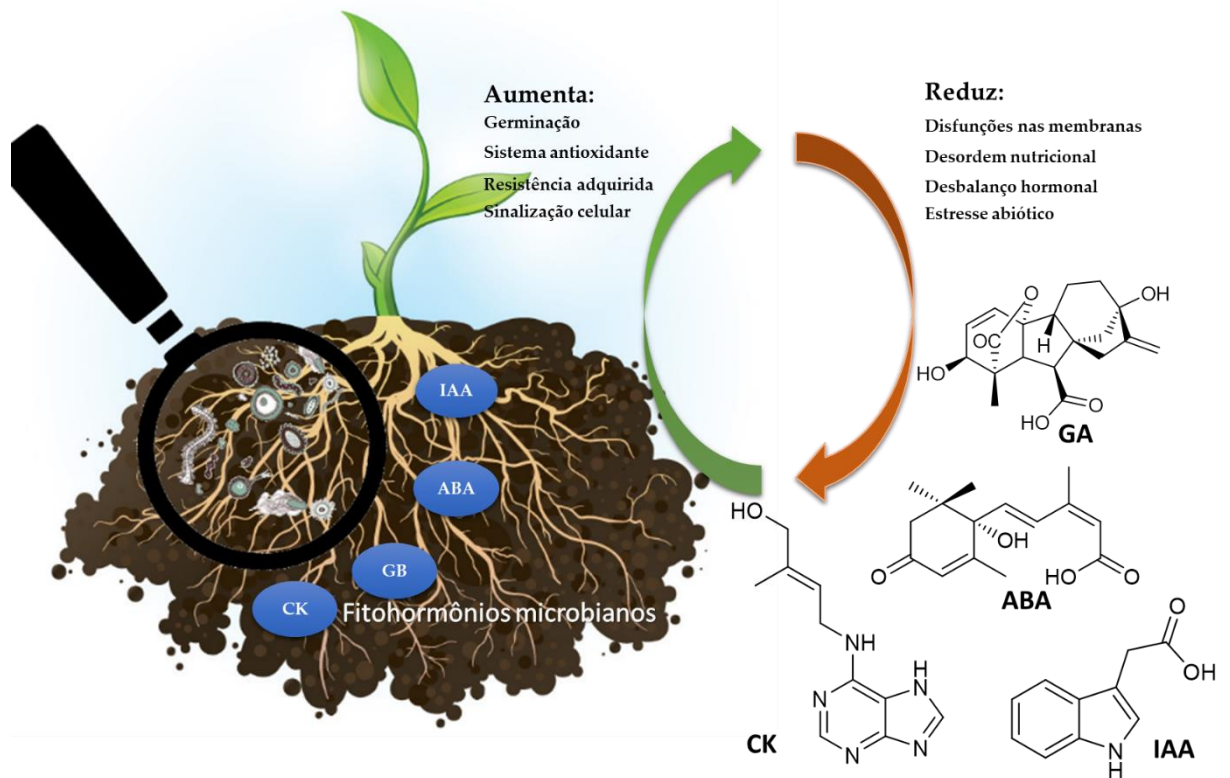


Figura 2.2. Esquema do mecanismo de interação entre a microbiota endofítica e presente na rizosfera e a planta.

A Tabela 2.1 exemplifica alguns fitormônios produzidos por bactérias e quais plantas hospedeiras são beneficiadas pela associação com esses microrganismos.

Tabela 2.1. Relação de fitormônio, microrganismos produtores e planta hospedeira.

Microrganismo	Fitohormônio	Planta	Referência
<i>Azospirillum lipoferum</i>	GA	<i>Triticum aestivum</i>	105
<i>Azospirillum brasilense</i>	ABA	<i>Arabidopsis sp.</i>	106
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	ABA	<i>Oryza sativa</i>	107
<i>Bacillus licheniformis</i>	ABA	<i>Vitis vinifera</i>	114
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ABA	<i>Vitis vinifera</i>	114
<i>Bacillus aryabhatai</i>	IAA, GA, ABA	<i>Glycine max</i>	115

Foi demonstrando por experimentos de espectrometria de massa, por análises em *full scan*, que o ABA era um dos metabólitos produzidos durante a fase de crescimento das culturas de *Azospirillum brasilense* sp 245. Experimentos adicionais revelaram que modificações nas condições de cultivo foram capazes de alterar a concentração desse metabólito no caldo de fermentação e a produção de ABA foi aumentada com a adição de NaCl ao meio de cultura¹⁰⁶.

Os benefícios promovidos aos hospedeiros pela presença de alguns microrganismos foram demonstrados por Cohen et al.^{106,107,108} por meio de experimentos com *A. brasilense* e *A. lipoferum* com os hospedeiros *Arabidopsis* e milho, respectivamente. Em 2008, Cohen et al.¹⁰⁶ demonstraram com experimentos de interação bactéria-hospedeiro que as sementes de *Arabidopsis* eram beneficiadas com o aumento da concentração de ABA quando inoculadas com *A. brasilense*.

Posteriormente, Cohen et al.¹⁰⁷ observaram que a inoculação de *A. lipoferum* em milho com 45 dias de cultivo promoveu não só o aumento da concentração de ABA como também reverteu processos inibitórios na síntese do ABA causados pela aplicação de fluridona.

Os resultados obtidos para *Arabidopsis* e milho foram confirmados em 2012 por Cohen et al.¹⁰⁸ ao utilizar *Arabidopsis thaliana* como modelo para analisar a base fisiológica pela qual o *Azospirillum* afeta a resposta da planta, especialmente sob condições de restrição de água.

Como resultado foi observado que tanto a inoculação do *Azospirillum* quanto a aplicação dos fitohormônios ABA, IAA e GA3 induziam alterações no crescimento e ramificação das raízes. Essa série de experimentos ilustra os benefícios da interação entre bactéria-planta hospedeira.

A produção de fitohormônios pelos microrganismos associados, bem como a alteração dos níveis desses na planta, podem minimizar os efeitos causados por estresses ambientais. Como consequências positivas da inoculação do *Azospirillum* também podem ser citados o aumento da produção de pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores, a resistência ao estresse hídrico em condições de restrição de água, aumento do rendimento de sementes, aumento na concentração de prolina e diminuição da condutância estomática¹⁰⁹⁻¹¹⁴.

As giberelinas compõem outra importante classe de metabólitos envolvida em inúmeros processos do ciclo de desenvolvimento das plantas como por exemplo: germinação das sementes, afloramento das plântulas, crescimento do caule e das folhas, florescimento, crescimento das flores e frutos⁸⁸. Embora a rota biossintética desse fitohormônio esteja completamente elucidada em plantas e fungos^{115,116}, ainda existem diversas lacunas para serem preenchidas na completa elucidação da rota em bactérias, haja vista que estudos com a bactéria simbiótica

Bradyrhizobium japonicum sugerem que a biossíntese do GA em bactérias ocorre por uma rota envolvendo o difosfato de *ent*-copalil e *ent*-kaureno^{117,118}.

A inoculação de *Azospirillum* spp. e *Bacillus* spp. em trigo, milho e arroz promoveram o crescimento das raízes das plantas, o aumento da concentração de N, aumento de níveis de GA₃, reversão de nanismo genético causado pelos inibidores da biossíntese de GA, e aumento no total de carboidrato acumulado¹¹⁹⁻¹²³.

B. pumilus e *B. licheniformis* apresentaram forte atividade promotora do crescimento de *Alnus glutinosa*. Extratos oriundos da co-cultura dessas bactérias mostraram-se efetivos na reversão do nanismo causada pela aplicação de Paclobutrazol® (um inibidor da biossíntese de GA). De fato, a análise desses extratos por GC-MS revelou a presença das giberilinas GA₁, GA₃, GA₄ e GA₂₀¹²⁴. Do mesmo modo que foi observado para o *Alnus glutinosa*, a interação entre bactéria e planta hospedeira também promoveu o crescimento de *Pinus pinea*, presumivelmente pelo aumento da produção de GA¹²⁵.

2 Objetivos

Analisar o perfil de compostos fixos produzidos por bactérias associadas à *Podocarpus macrophyllus*.

Desenvolver um método de análise de compostos voláteis por GC-MS.

Analisar o perfil de compostos voláteis do óleo essencial de *Podocarpus macrophyllus*.

Analisar o perfil de compostos voláteis das bactérias associadas à *Podocarpus macrophyllus*.

Avaliar a interação entre bactérias e fungos do *Podocarpus macrophyllus*.

2.1 Objetivos específicos

Diferenciar espécies de microrganismos utilizando os *fingerprints* de MALD-TOF MS adquiridos nas regiões de 700 a 3000 Da e 2000 a 20000 Da e ferramentas de análise multivariada, e identificar metabólitos alvos que diferenciem os microrganismos.

Isolar e identificar alguns dos compostos fixos produzidos por bactérias associadas à *Podocarpus macrophyllus*.

Elaborar uma biblioteca dos compostos presentes no óleo essencial de *Podocarpus macrophyllus* e em suas bactérias endofíticas cultivadas sob diferentes condições. Avaliar se há correlação entre os metabólitos voláteis dos microrganismos e sua planta hospedeira.

Analisar a lista de compostos voláteis produzidos por bactérias em busca de compostos terpenoides.

Identificar os compostos terpenoides presentes no óleo essencial do *Podocarpus macrophyllus*.

Avaliar a interação entre os isolados LaBioMMi 1180 com diferentes fungos associados ao *Podocarpus macrophyllus* por meio dos metabolitos produzidos por essa bactéria.

3 Métodos

3.1 Materiais e reagentes utilizados no o cultivo dos microrganismos

Agar Nutriente - marca: HIMEDIA®

Extrato de carne – marca: HIMEDIA®

Extrato de levedura - marca: HIMEDIA®

Peptona G – marca: HIMEDIA®

Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico - marca: Sigma Aldrich®

Acetonitrila HPLC – marca: Panreac®

Isopropanol HPLC – marca: Sigma Aldrich®

Glicerol – marca: Synth®

Glicose – marca: Synth®

Ácido 3-morfolino-4-il-propano-1-sulfônico (MOPS)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – marca: Synth®

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – marca: Synth®

K_2HPO_4 - marca Synth®

NaCl - marca: Synth®

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – marca: Synth®

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – marca: Synth®

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – marca: Synth®

CaCO_3 – marca: Synth®

Etanol 70 %

Hipoclorito de sódio 4%

Água destilada

Água MilliQ

Alça

Bisturi

Pinça

Espátula

Bastão de vidro

Palito de dente

Papel de filtro

Becker 250 mL

Erlenmeyer 1000 mL

Placa de petri 9 mm

Papel de filtro qualitativo (80 g/m², 11 cm) UNIFIL® e n° 1 WHATMAN®

Eppendorf 2 mL

3.2 Equipamentos utilizados para o cultivo e isolamento de microrganismos

Autoclaves PHOENIX® AV 30 e AV 75

Balanças Tecnal® Mark 210 A Classe I, Mark 2200 classe II e Shimadzu AUY220

BOD Tecnal® TE-371 e TE391

Câmara de fluxo laminar vertical PACHANE® modelo 50

Estufa Bacteriológica

3.3 Equipamentos utilizados para a isolamento dos compostos e identificação dos produzidos pelos isolados LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202

Aparato de Clevenger

Ultrassom UNIQUE® USC-1800A

Centrifuga Eppendorf® 5810 R

Espectrômetro de massas BRUKER® Autoflex Speed MALDI-TOF/TOF no modo positivo, equipado com Smartbean-II laser technology com taxa de repetição ajustável até 1 kHz (355 nm), operando em modo linear e controlado pelo *software* FlexControl® versão 3.3 da Bruker Daltonics® com aquisição automática de dados

Target para MALDI-TOF BRUKER® MTP-384 ground steel TP S/N 05480 part number 209519

Cromatógrafo a gás SHIMADZU® QP2010 Plus equipado com fonte de ionização por elétrons de energia variável e *software* SHIMADZU® GCMS Solutions 2.53 SU3

Coluna RESTEK® Rtx-5MS (Crossbond® 5% difenil/95% dimetilpolisiloxano) 0,25 µm x 30 m serial #1146014

Cromatógrafo a líquido analítico/preparativo equipado com bombas LC-20AP SHIMADZU®, controladora CBM-20A SHIMADZU®, degaseificador DGU-20A5 SHIMADZU®, detector de ultravioleta SPD-20AV SHIMADZU® e coletor automático FRC-10A SHIMADZU®

Fases estacionárias para cromatografia líquida de bancada sílica gel 230-400 mesh (flash) MERC®

Manta de aquecimento FISATOM® 202E

Papel de filtro qualitativo (80 g/m², 11 cm) UNIFIL® e n° 1 WHATMAN®;

Speedvac CHRIST® RVC 2-33 IR

Sistema de água ultrapura ELGA® Purelab Classic modelo CLXXXUVM

Estufa bacteriológica

Estufa FANEM® 315 SE

pHmetro Tecnal® Tec-3MP

Ultrassom UNIQUE® USC-1800A

Pipeta automática 10 µL Eppendorf

Pipeta automática 1000 µL Eppendorf

Ponteira descartável 100 µL

Ponteira descartável 1000 µL

Gases de pureza 5.0: argônio, hélio e ar sintético WHITE MARTINS®

Metano HPLC marca: Panreac®

Acetonitrila HPLC marca: Panreac®

Cicloexano HPLC marca: Panreac®

Clorofórmico HPLC marca: Panreac®

Solventes para cromatografia líquida de bancada e extração de experimentos, destilados no DQ-UFSCar: acetato de etila, etanol, hexano e metanol

3.4 Softwares utilizados no processamento dos dados dos experimentos de indentificação de microrganismos endofíticos e avaliação da comunidade bacteriana associada à *Podocarpus macrophyllus*

flexAnalysis® 3.3 (Build 65) Bruker Daltonics® GmbH

MALDI Biotyper® OC 3.1 Bruker Daltonics® GmbH

Excel pacote office® 365

3.5 Avaliação do perfil de compostos fixos produzidos por *Bacillus* spp.

3.5.1 Metodologia de preparo das amostras para aquisição dos espectros de MALDI - TOF MS

A metodologia empregada no preparo das amostras visava a utilização de células intactas que propiciam a rápida aquisição com pouquíssimo pré-tratamento da amostra e a aquisição de espectros com maior número de sinais quando comparados a outras metodologias de preparo de amostra^{61,62}.

As amostras consistiam no esfregão direto, com o auxílio de um palito de madeira, do material biológico proveniente de uma colônia da placa de cultura, sobre o *spot* da placa de análise. Posteriormente, 1 µL de solução de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico na concentração de 20 mg.mL⁻¹, preparado em solução 1:1 v/v acetonitrila:água com 0,1% ácido trifluoroacético, foi aplicado sobre o *spot* da amostra com posterior evaporação do solvente à temperatura ambiente. Cada microrganismo isolado foi cultivado em triplicata e cada um desses foi aplicado em 16 *spots* da placa de análise, de forma que o total de 48 espectros foram adquiridos, com os mesmos parâmetros de aquisição de dados.

3.5.2 Metodologia de aquisição de espectros MALDI-TOF MS

Os espectros foram adquiridos em um espectrômetro de massas Bruker® *Autoflex speed* (Bruker Daltonics®, GmbH) equipado com o laser *Smartbear* II (355 nm) e operado pelo *software* flexControl® (versão 3.3, Bruker Daltonics, GmbH). O equipamento foi previamente calibrado com o padrão BTS (Bacterial Test Standard, Bruker Daltonics®, GmbH) ou a cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922 CHB ou DH5alpha BRL, com 24 horas de incubação a 37°C em meio Mueller Hinton.

A intensidade do laser foi ajustada de acordo com o padrão de calibração e os espectros foram adquiridos nos modos linear, MALDI(+)-TOF MS e reflectron, MALDI(+)-TOF/TOF MS de aquisição de íon na faixa dinâmica de 2000 a 20000 Da para o modo linear e 700 a 3000 Da para o modo reflectron.

Os espectros foram adquiridos aleatoriamente em diferentes posições do *spot* por meio de movimento randômico no modo automático de aquisição do

software FlexControl®. Os parâmetros do espectrômetro em cada modo estão listados na tabela abaixo:

Tabela 2.2. Descrição dos parâmetros dos métodos utilizados na aquisição de íons para o modo linear e reflectron.

Parâmetro	Modo Linear	Modo Reflectron
<i>Number of shots</i>	2000	2000
<i>Laser repetition rate</i>	1000	1000
<i>Ion source voltage 1</i>	20 kV	20 kV
<i>Ion source voltage 2</i>	18,5 kV	17,4 kV
<i>Lens voltage</i>	8,2 kV	8,5 kV
<i>Reflector voltage 1</i>		22 kV
<i>Reflector voltage 2</i>		10 kV

3.5.3 Processamento dos dados de MALDI - TOF MS e MALDI - TOF/TOF MS

Os dados adquiridos foram processados utilizando os softwares flexAnalysis® versão 3.3 e MALDI Biotyper® 3.1 (Bruker Daltonics GmbH). Previamente as análises realizadas: comparação com o banco de dados de espectros do Biotyper®, as análises de componentes principais (PCA) e matriz de índice de correlação (CCI), os espectros foram pré-processados de acordo com parâmetros padrões recomendados para cada uma dessas análises. A seguir os parâmetros de pré-processamento estão listados:

Tabela 2.3. Parâmetros utilizados no pré-processamento para identificação das bactérias, análise de componentes principais e matriz de índice de correlação.

	<i>Parameter</i>	<i>Standard</i>	<i>PCA</i>	<i>CCI</i>
<i>Mass</i>	<i>Range [Da]</i>	3000-15000	700-2500	700-2500 3000-15000
	<i>Method</i>	<i>Spectra compressing</i>	<i>Selected range</i>	<i>Selected range</i>
<i>Smoothing</i>	<i>Method</i>	<i>Savitsky-Golay</i>	<i>Savitsky-Golay</i>	<i>Savitsky-Golay</i>
	<i>Frame size [Da]</i>	25	25	25
	<i>Nº of runs</i>	2	2	2
<i>Normalization</i>	<i>Método</i>	<i>Maximum norm</i>	<i>Minimum</i>	<i>Minimum</i>
<i>Peak Picking</i>	<i>Max. Peak</i>	100	100	100
	<i>Thresold</i>	0,001	0,01	0,01
	<i>Method</i>	<i>Spectra differentiation</i>	<i>Peak fitting</i>	<i>Peak fitting</i>
	<i>Profile</i>	S/N = 3	<i>Gauss</i>	<i>Gauss</i>

Tabela 2.4. Parâmetros do procedimento de criação de MSP e comparação com a biblioteca

	<i>Parameter</i>	<i>Value</i>
<i>MSP Creation</i>	<i>Max. Mass Error of Each Single Spectrum</i>	2000
	<i>Desired Mass Error for the MSP</i>	200
	<i>Desired Peak Frequency Minimum (%)</i>	25
	<i>Max. Desired Peak Number of the MSP</i>	70
<i>MSP identification</i>	<i>Frequency Threshold for Spectra Adjusting</i>	50
	<i>Frequency Threshold for Score Calculation</i>	5
	<i>Max. Mass Error of the Raw Spectrum</i>	2000
	<i>Des. Mass Tolerance of the Adjusted Spectrum</i>	250
	<i>Furthermore Accepted Mass Tolerance of Peak</i>	600
	<i>Parameter of the Intesity Correction Function</i>	0,25
<i>MSP clustering</i>	<i>Distance Measure</i>	<i>Correlation</i>
	<i>Linkage</i>	<i>Average</i>
	<i>Score Threshold Value for a Single Organism</i>	300

Tabela 2.5 Parâmetros para as análises de componentes principais (PCA) e matriz de índice de correlação (CCI).

	<i>Parameter</i>	<i>Value</i>
<i>PCA and CCI creation</i>	<i>Lower bound</i>	700 e 3000
	<i>Upper Bound</i>	2500 e15000
	<i>Resolution</i>	02-04
<i>PCA Clustering</i>	<i>Method</i>	<i>Hierarchical</i>
	<i>Distance Measure</i>	<i>Correlation</i>
	<i>Linkage Algorithm</i>	<i>Average</i>
	<i>Maximal Cluster</i>	4
<i>CCI Parameter</i>	<i>Intervals</i>	8

3.5.4 Experimento de cultivo em escala ampliada

Com intuito de se isolar metabólitos secundários produzidos pelos isolados LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202, foram realizados cultivos em larga escala de 20 litros de meio de cultura.

Previamente aos cultivos, as bactérias foram reativadas a partir de conservas que estavam armazenadas em freezer a -20 °C. Os isolados foram reativados em placas de petri de 9 mm contendo Nutriente Agar. Posteriormente a

reativação, os inóculos foram preparados em 6 mL de caldo Nutriente. As bactérias foram cultivadas em erlenmeyers de 1 L contendo 330 mL de caldo Nutriente, os microrganismos foram mantidos em incubadora por 14 dias a 37 °C e 120 rpm de agitação.

Ao final do período de cultivo, a biomassa de células foi separada por meio de centrifugação a 5000 rpm, utilizando uma centrífuga da marca Eppendorf®, modelo 5810R. O *pellet* formado foi ressuscitado e lavado com o meio de cultura estéril.

Ao ser precipitado novamente, o *pellet* foi extraído com solução de metanol 70% por 15 minutos em ultrassom. Os resíduos de material celular foram separados por centrifugação a 7000 rpm. O sobrenadante foi coletado e seco em speedvac CHRIST® RVC 2-33 IR. O procedimento de extração foi realizado em triplicada.

3.5.5 Fracionamento dos extratos bacterianos

Os extratos de LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202 foram ressuscitados em acetato de etila e misturados com sílica gel para realizar o procedimento de *clean up* em coluna filtrante. O procedimento foi realizado em uma coluna de 30 cm de comprimento x 7 cm diâmetro contendo 90 g de sílica gel flash, e o procedimento foi realizado sob vácuo. Os extratos foram eluídos com 500 mL de cada uma das misturas de: Hexano: Acetato de etila (9:1), Hexano: Acetato de etila (1:1), Acetato de etila 100%, Acetato de etila: Metanol (9:1), Acetato de etila: Metanol (1:1) e Metanol 100%. As frações foram coletadas em balões de 1000 mL e evaporadas em rotavapor.

O extrato obtido foi ressuscitado em acetato de etila e transferido para recipientes previamente pesados e posteriormente secos em *dry block* sob fluxo de ar comprimido. As 6 frações obtidas foram analisadas por cromatografia de camada delgada, utilizando placas com fase estacionária ODS e misturas de Metano:Água em diversas proporções foram utilizadas como eluente. As frações similares foram agrupadas e fracionadas em um cromatógrafo em escala preparativa. As separações das frações foram realizadas em modo isocrático utilizando uma coluna para cromatografia líquida de alta eficiência em modo preparativo Luna Phenyl-Hexyl 10 μ 100Å 250 x 21,2 mm PHENOMENEX®, empregando fluxo de 10 mL/min e detector

de índice de refração. As fases móveis empregadas no fracionamento do modo isocrático de separação foram previamente estabelecidas em separações em pequena escala, utilizando cromatografia de camada delgada.

3.6 Avaliação do perfil de compostos voláteis produzidos por *Bacillus* spp.

3.6.1 Procedimento de cultivo das bactérias e processo de hidrodestilação

O perfil de compostos voláteis (VOCs) produzidos pelos isolados LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*), LaBioMMi 1141 (*Bacillus licheniformis*), LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*) e LaBioMMi 1202 (*Bacillus subtilis*) foi avaliado sob diferentes condições de crescimento com o intuito de se analisar a alteração no perfil de compostos produzidos e induzir a produção de terpenoides.

Tais isolados foram cultivados, em triplicata, em 400 mL de 3 meios distintos. Dois meios de cultura com composições distintas foram utilizados para a indução da produção de compostos terpenoides e para a avaliação da alteração do perfil de produção de compostos voláteis. A composição do meio de cultura (1) era: glucose 60 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, MgSO₄·7H₂O (0,1 g), K₂HPO₄ (0,5 g), NaCl (2 g), FeSO₄·7H₂O (0,05 g), ZnSO₄·7H₂O (0,05 g), MnSO₄·4H₂O (0,05 g), CaCO₃ (5 g), extrato de levedura (2 g), em um litro de água destilada e com pH ajustado 7.0.

A composição do meio de cultura (2) era: glicose (20 g), extrato de levedura (5g), 10 mM de ácido 3-morfolino-4-il-propano-1-sulfônico (MOPS), 400 mL de composição de sais M9. Tais meios já foram relatados na literatura para a expressão heteróloga de genes de *Bacillus* spp. atribuídos a terpeno sintase¹²⁶. O meio de cultura (3) avaliado foi o caldo Nutriente, composto por 3,0 g de extrato de carne e 5,0 g de peptona G.

Os isolados LaBioMMi 1137, 1141, 1180, 1196, 1198, 1201, 1202 foram cultivados em 400 mL de cada meio de cultura, em balões de 1 L por 7 dias a 37 °C. Ao final do período de incubação o caldo de fermentação obtido foi hidrodestilado.

Os balões foram aquecidos até o ponto de fervura e quando o vapor atingiu o topo do condensador 3 mL de éter etílico (EtO₂) foram adicionados e o processo de hidrodestilação foi mantido por 1 hora. A fase etérea foi separada e em

seguida foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), os compostos voláteis retidos na fase etérea foram analisados por CG-MS.

3.6.2 Procedimento de análise dos compostos voláteis por CG-MS

O cromatogramas dos compostos voláteis produzidos pelas bactérias endofíticas associadas ao *Podocarpus macrophyllus* foram obtidos em um cromatografo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, da marca Shimadzu®, modelo GC-MS QP2010 Plus. O método de análise utilizado no GC-MS consistia na utilização de uma coluna de sílica fundida Rxi-5MS (5% difenil/95% dimetilpolisiloxano) de 10 metros. A pressão empregada foi de 263,8 kPa, fluxo total de 17 mL/min, fluxo na coluna de 0,45 mL/min, modo de injeção *splitless* com 30 segundos de amostragem, temperatura de injeção de 250 °C com temperatura inicial do forno de 40 °C. Após 1 minuto de estabilização a temperatura do forno foi aumentada até 320 °C a uma taxa de aquecimento de 35 °C/min com posterior estabilização por 1 minuto.

A temperatura da fonte de íons utilizada foi de 200 °C e a temperatura da interface de transferência de 250 °C. O *solvent cut time* foi de 1,45 min e o tempo de aquisição de dados de 10 minutos, a faixa dinâmica utilizada foi de 40 a 650 Da com velocidade de varredura de 10000. Ao final das análises e posterior processamento dos dados, os índices de retenção para cada um dos compostos foram calculados e comparados com os valores tabelados na literatura.

3.7 Experimento de interação de crescimento do isolado LaBioMMi 1180 e fungos endofíticos de *Podocarpus macrophyllus*.

3.7.1 Procedimento de co-cultivo do isolado LaBioMMi 1180 e fungos endofíticos de *Podocarpus macrophyllus*

Previamente a execução dos experimentos de co-cultivo, os microrganismos foram reativados a partir de suas conservas, sendo que os fungos foram cultivados em meio BDA, por 7 dias a temperatura de 28 °C e a bactéria LaBioMMi 1180 em meio NA por 24 dias a 37 °C. Os experimentos de co-cultivo foram realizados em placas de petri e os meios de cultura BDA e R2A foram avaliados. Cada microrganismo foi inoculado em uma região da placa e ao final do cultivo por 14 dias a 28 °C, a área ocupada durante o crescimento do fungo foi determinada segundo a Equação 1:

$$\text{Área de crescimento} = \pi \cdot (r_1 \cdot r_2) \quad \text{Equação 2.1}$$

Na qual r_1 e r_2 são os raios das colônias dos fungos, em milímetros, medidos perpendicularmente um ao outro. Posteriormente, amostras de diferentes regiões da placa foram extraídas com mistura de acetato de etila: diclorometano:metanol na proporção de 2:3:1, com 1% de ácido fórmico. Os extratos obtidos foram secos e analisados por MALDI TOF/TOF MS.

4 Resultados e discussões

4.1 Avaliação do perfil de compostos fixos produzidos pelas cepas LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202 de *Bacillus* spp.

A Figura 2.3 ilustra a análise de correlação para os espectros dos *Bacillus* spp. isolados de *Podocarpus macrophyllus*. Esse resultado está de acordo com o que foi demonstrado no capítulo 1, pois nessa figura é possível distinguir três grupos distintos de *Bacillus* para região de 2000 a 20000 Da e quatro grupos para região de 700 a 3000 Da. Conforme o que está listado na Tabela 1 do Apêndice, as indicações de espécies para as cepas desses isolados são LaBioMMi 1131, 1141, 1142, 1163 e 1178 *Bacillus licheniformes* (score: 2,082) e LaBioMMi 1136, 1196 e 1197 *Bacillus cereus* (score: 2,046). Os isolados LaBioMMi 1137, 1180 e 1202 foram indicados como *Bacillus* spp. pela análise do Biotyper e identificados posteriormente como *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis*, respectivamente, através do sequenciamento da região 16S rRNA.

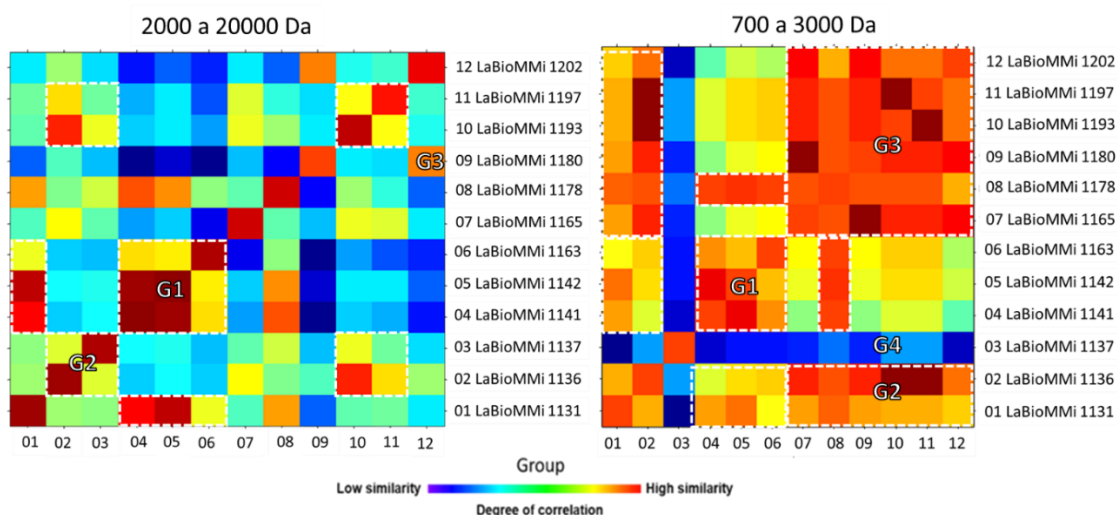


Figura 2.3. Análise de correlação entre os espectros de MALDI-TOF MS na região de 700 a 3000 Da e 2000 a 20000 Da dos *Bacillus* spp. isolados de *Podocarpus macrophyllus*.

Na Figura 2.3 o grupo G1, da região de 2000 a 20000 Da, apresenta correlação superior a 0,68 a 0,95 para os isolados LaBioMMi 1131, 1141, 1142, 1163 e 1178.

Os isolados LaBioMMi 1136, 1137, 1193 e 1197, grupo G2, apresentam menor índice de correlação entre seus espectros, mesmo ambos tendo recebido confirmação para o gênero *Bacillus* e indicação para a espécie *Bacillus cereus* para o LaBioMMi 1136, 1193 e 1197 e o isolado LaBioMMi 1137 tendo recebido confirmação, por meio sequenciamento da região 16S rRNA, como *Bacillus pumilus*. Os isolados LaBioMMi 1180 e 1202, grupo G3, apresentaram correlação de 0,75 e posteriormente foram confirmados como *Bacillus subtilis* a partir do sequenciamento da região 16S rRNA. Em contrapartida, há uma ligeira diferença dos agrupamentos quando observados para a região de 700 a 3000 Da. No geral, os mesmo grupos são observados com intensidades superiores às observadas para região de 2000 a 20000 Da.

Adicionalmente, são observados quatro agrupamentos, com relação às diferenças do perfil de sinais na região de 700 a 3000 Da, sendo que três apresentam correlações entre si. O agrupamento G1 é observado tanto na região de 2000 a 20000 Da quanto na região de 700 a 3000 Da, demonstrando que esses isolados apresentam o mesmo perfil em ambas as regiões, podendo-se inferir que se tratam da mesma espécie de bactéria. Ainda assim, é possível observar alta correlação de G1 com os espectros de G2 e G3, possivelmente devido a semelhanças em alguns dos marcadores presentes na região de 700 a 3000 Da do *fingerprint* desses isolados. Por fim, apenas do isolado LaBioMMi 1137 distinguiu-se dos demais, apresentando correlação da ordem 0.50.

As Figura 2.4 e Figura 2.5 ilustram os gráficos de *scores* e *loadings* e seus respectivos espectros de MALDI-TOF MS adquiridos na região de 700 a 3000 Da. Assim como observado para a região de 2000 a 20000 Da, no gráfico de PCA da Figura 2.4 também é possível visualizar três grupos distintos relativos a *Bacillus* spp. sendo um deles relativo aos espectros do isolados LaBioMMi 1137, um segundo grupo

relativo aos espectros do LaBioMMi 1141, e por fim um agrupamento relativo aos espectros dos isolados LaBioMMi 1180 e 1202.

Conforme pode se observar nos gráficos de *scores* da Figura 2.4 e nos espectros Figura 2.5, os espectros do LaBioMMi 1137 encontram-se distribuídos nos quadrantes positivos da PC1 e PC3, e no quadrante negativo para a PC2 de modo que, ao se verificar no gráfico de *loadings* essas regiões são referentes dos marcadores nas regiões entre aproximadamente 1008 a 1120 Da e também 1340 Da.

O agrupamento de espectros referentes ao isolado LaBioMMi 1141 distribui-se ao longo dos quadrantes positivos da PC1 e PC2, e no quadrante negativo da PC3, de modo que os mesmos se distinguem principalmente devido aos marcadores nas regiões de aproximadamente 1008 a 1120 Da e 1740 Da.

Por fim, os espectros dos isolados LaBioMMi 1180 e 1202 distribuem-se ao longo dos quadrantes positivos da PC1, PC2 e PC3 de modo que os marcadores para esses isolados estão presentes nas regiões de 1008 a 1120 Da e 1540 Da.

Tais resultados podem ser verificados na Figura 2.5 na qual é possível observar as regiões que distinguem cada um dos microrganismos isolados com relação ao seu perfil metabólico na região de 700 a 3000 Da. Vale ressaltar que a variância acumulada para a PC1, PC2 e PC3 era superior de 80%, demonstrando que o modelo obtido para a separação desses isolados está bem adequado.

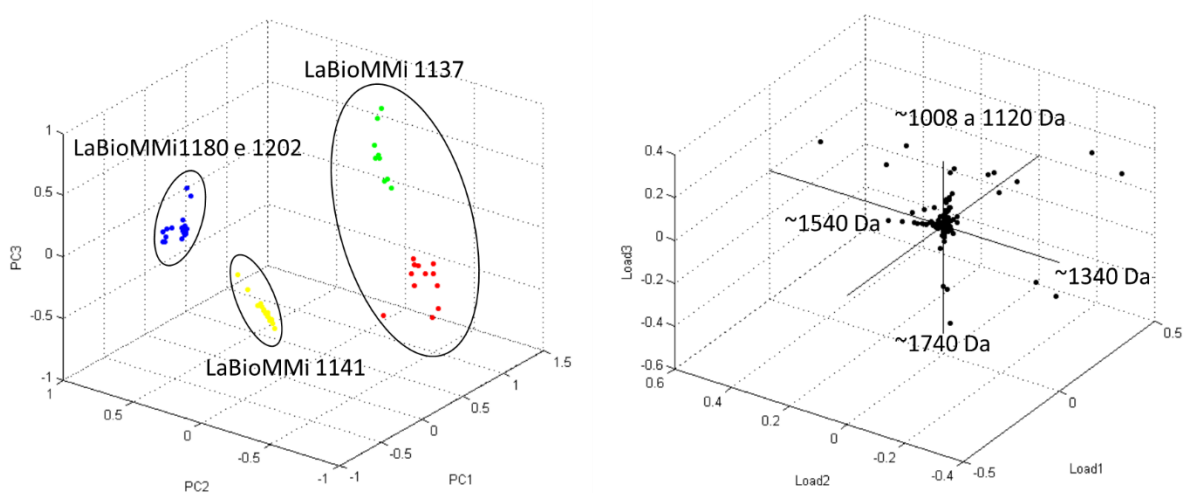


Figura 2.4. Gráfico de *scores* e *loadings* para os espectros, na região de 700 a 3000 Da, dos *Bacillus* spp. isolados de *Podocarpus macrophyllus*.

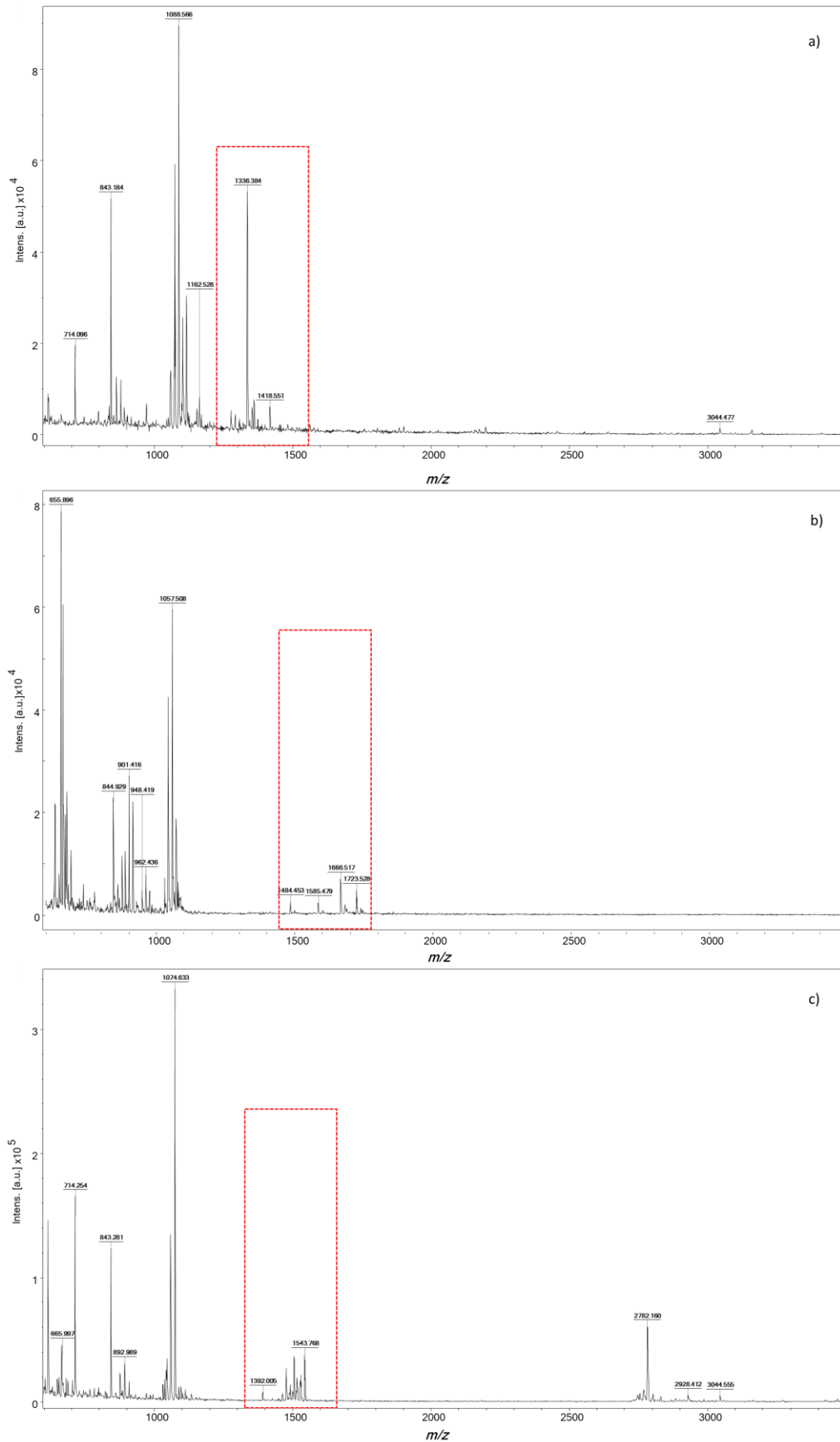


Figura 2.5. Espectros de MALDI-TOF MS, na região de 700 a 3000 Da, para *Bacillus* spp. isolados de *Podocarpus macrophyllus*: a) LaBioMMi 1137, b) LaBioMMi 1141 e c) LaBioMMi 1202.

Sabe-se que *Bacillus* spp. são hábeis produtores de lipopeptídeos sendo esses metabólitos das classes das surfactinas, iturinas e fengicinas e tais metabólitos apresentam massa compatível com as regiões dos marcadores observados nos gráficos de *loadings* da Figura 2.4¹²⁷⁻¹³⁰.

Ao analisar os espectros das células intactas dos isolados LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202 foram ser identificados compostos, listados na Tabela 2.6. De modo, geral a maioria dos sinais apresentou boa resolução, razão sinal/ruído, padrão isotópico compatível com a fórmula molecular do metabólito e exatidão de massas compatível, tanto para as moléculas protonadas quanto para os adutos de sódio e potássio, com o MALD-TOF/TOF MS operando no modo reflectron.

Tabela 2.6 Lista de compostos identificados diretamente das células intactas de *Bacillus* spp.

Nº	Meio	Composto	Formula	MW	Erro [ppm]													
					LaBioMMi 1137			LaBioMMi 1141			LaBioMMi 1180			LaBioMMi 1202				
					[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺		
1	NA/R2A	Iturina A1	C ₄₇ H ₇₂ N ₁₂ O ₁₄	1028.5285				0.15										
2	NA/R2A	Iturina A2	C ₄₈ H ₇₄ N ₁₂ O ₁₄	1042.5442				0.07										
3	NA/R2A	Iturina A3	C ₄₉ H ₇₆ N ₁₂ O ₁₄	1056.5598				0.03	3.96	4.50								
4	NA/R2A	Iturina A6	C ₅₀ H ₇₈ N ₁₂ O ₁₄	1070.5755				6.88										
5	NA/R2A	Iturina C1	C ₄₆ H ₇₃ N ₁₁ O ₁₅	1043.5282	4.89													
6	NA/R2A	Iturina C2	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₁ O ₁₅	1057.5438	5.71													
7	NA/R2A	Iturina C3	C ₅₀ H ₇₇ N ₁₁ O ₁₅	1071.5595	5.71													
8	NA/R2A	Iturina C4	C ₅₁ H ₇₉ N ₁₁ O ₁₅	1085.5751	5.37													
9	NA/R2A	Surfactina (C13)	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1007.6513							1.70	4.90		7.61	2.57			
10	NA/R2A	Surfactina (C14)	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1021.6669							6.69	4.35		7.34	4.09			
11	NA/R2A	Surfactina (C15)	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1035.6826							5.30	4.77	4.11	8.88	3.37	2.90		
12	NA/R2A	Surfactina (C16)	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1049.6982									5.82					
13	NA/R2A	Surfactina (C17)	C ₅₅ H ₉₇ N ₇ O ₁₃	1063.7139														
14	NA/R2A	Surfactina (C18)	C ₅₆ H ₉₉ N ₇ O ₁₃	1077.7295														
15	R2A	3(S)-epi-Aza-surfactina	C ₅₃ H ₉₄ N ₆ O ₁₂	1034.6985				3.62	2.21	5.59								
16	NA/R2A	Fengicina (C17) 6-Ala	C ₇₃ H ₁₁₂ N ₁₂ O ₂₀	1476.8110							1.79	6.40	4.80					
17	NA/R2A	Fengicina (C16) 6-Val	C ₇₄ H ₁₁₄ N ₁₂ O ₂₀	1490.8266							5.82	7.95	6.96					
18	NA/R2A	Fengicina (C17) 6-Val	C ₇₅ H ₁₁₆ N ₁₂ O ₂₀	1504.8423							5.01	2.73	2.81	5.72	5.87	6.59		

As Figuras 2.6, 2.7 e 2.8 ilustram os espectro das fragmentações, através da dissociação induzida por colisão (CID), dos íons selecionados 1029 Da, 1044 Da e 1072 Da dos espectros obtidos a partir das células intactas de *Bacillus* spp., cultivadas nos meios de cultura Agar Nutriente e R2A.

A faixa dinâmica de seleção para extração dos íons de desejo é determinada automaticamente pelo do *software*, de modo que dependendo da massa do íon precursor a faixa determinada pelo equipamento pode ser maior ou menor. Ajustes manuais na faixa de seleção podem ser realizados, contudo podem incorrer em perda de sensibilidade e na abundância de íons, o que pode comprometer a qualidade do experimento de fragmentação dos íons precursores. Ao se analisar as massas moleculares dos metabólitos Iturina A1, A2 e A6, e Surfactina (C13), Surfactina (C14) e Surfactina (C16) e possível de se verificar a diferença de massas dos íons oriundos das moléculas de Iturina protonadas e dos adutos de sódio

formados com as surfactinas é de aproximadamente 1.10 Da, de modo que o equipamento não possui resolução o suficiente para separar esse conjunto de íons para que ambos sejam fragmentados isoladamente. Dessa forma, como pode se observar nas Figura 2.6, 2.7 e 2.8 há a presença do padrão de fragmentação das duas moléculas no espectro obtido.

As moléculas de surfactina são lipopeptídeos cíclicos caracterizados pela sequência de amino ácidos: Iso/Leucina - Iso/Leucina - Asparagina - Valina - Iso/Leucina - Iso/Leucina - Ácido Glutâmico e o ciclo é formado através de uma ligação éster da hidroxila do carbono beta do ácido graxo ligado ao ácido glutâmico, com o grupo amida do aminoácido Iso/Leucina. Por outro lado, os lipopeptídeos Iturina são caracterizados pela sequência de amino ácidos: Serina – Asparagina – Prolina – Glutamina – Asparagina – Tirosina – Asparagina e o ciclo é formado através de uma ligação amida entre o grupo amino do carbono beta do ácido graxo ligado a asparagina, com a carboxila do aminoácido Serina.

Nas Figura 2.6, 2.7 e 2.8 é possível visualizar duas sequências de perdas distintas, características das perdas dos resíduos dos aminoácidos que compõem as moléculas de surfactina e iturina.

Na Figura 2.6 para o aduto de sódio da surfactina, 1030 Da, é possível visualizar as perdas em sequência dos resíduos de Iso/Leucina – Iso/Leucina - Ácido Aspártico – Valina e Iso/Leucina. Para a Iturina A1 protonada, 1029 Da, a sequência observada, de perda de resíduos, é Serina – β amino ácido graxo – Asparagina – Tirosina – Asparagina – Glutamina. Na Figura 2.7, para o aduto de sódio da surfactina, 1044 Da, a sequência de perdas de resíduos dos aminoácidos foi idêntica à observada na Figura 2.6.

Entretanto, para a molécula de Iturina A1 protonada, 1043 Da, a sequência observada, de perda de resíduos, é Serina – Asparagina – Prolina – Glutamina – Asparagina – Tirosina – Asparagina. Por fim, Figura 2.8 para o aduto de sódio da surfactina, 1072 Da, os padrões de fragmentação observados foram diferentes dos obtidos para as moléculas anteriores.

Nesse é possível observar uma perda em comum de duas Iso/Leucina, posteriormente as mesmas foram observadas duas sequências, uma seguida pela perda de Valina e outra pela perda de Ácido Aspártico. Os íons relativos à perda dos

aminoácidos subsequentes não foram observados, mas a perda de valores relativos à perda conjunta de Ácido Aspártico e Iso/Leucina (228 Da) e Valina e Iso/Leucina (212 Da) foram possíveis de serem identificadas. Por fim, as duas sequencias terminam com a perda do resíduo de Iso/Leucina. Assim como para a surfactina, para a Iturina A1 protonada, 1071 Da, observou-se a perda inicial do resíduo de Serina, seguida por duas rotas, em uma delas houve a perda sequencial de Asparagina, seguida pela perda conjunta de Glutamina e Prolina. Na outra rota, houve a perda do resíduo do ácido graxo, seguido pela perda do resíduo de Asparagina. Assim, ao se conciliar os dados dos experimentos de fragmentação e a comprovação dos padrões condizentes com as moléculas, e os dados da aquisição das massas dessas moléculas nos espectros com alta resolução e exatidão, pode-se confirmar assim a detecção desses metabólitos nas células intactas de *Bacillus* spp.

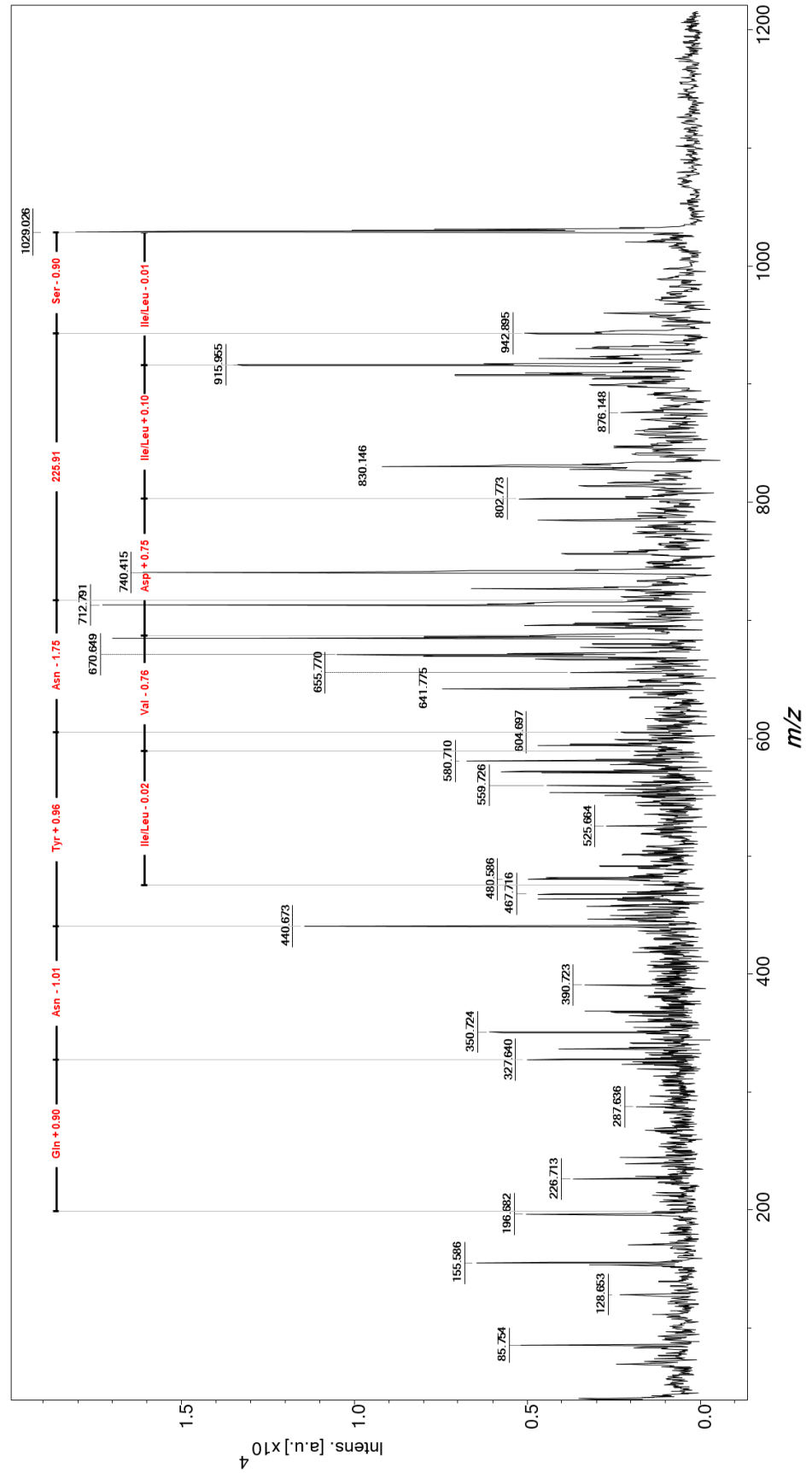


Figura 2.6. Ilustração da fragmentação CID do íon 1029 Da por MALDI-TOF MS/MS, para células intactas de *Bacillus* spp.

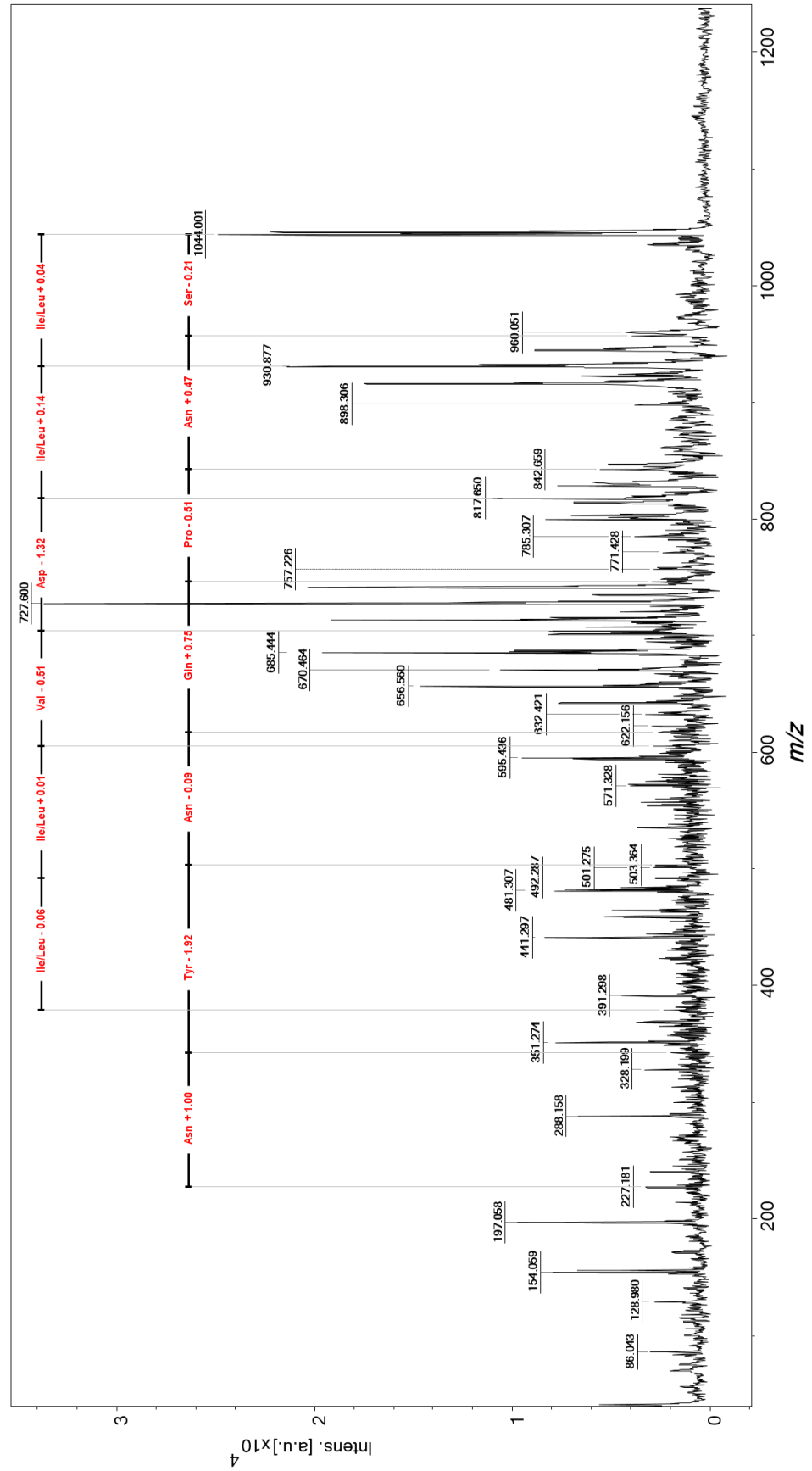


Figura 2.7. Ilustração da fragmentação CID do íon 1044 Da por MALDI-TOF MS/MS, para células intactas de *Bacillus* spp.

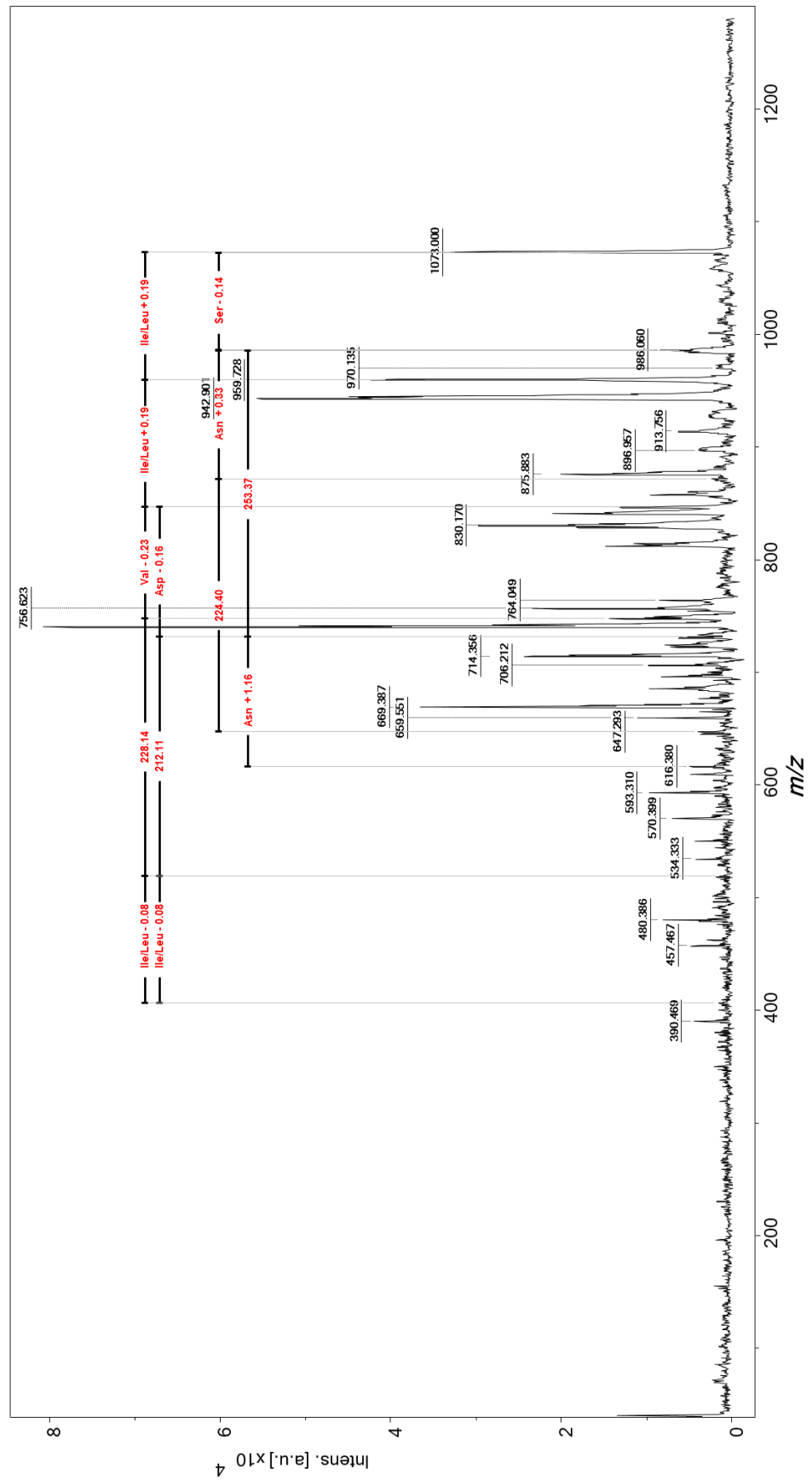


Figura 2.8. Ilustração da fragmentação CID do íon 1072 Da por MALDI-TOF MS/MS, para células intactas de *Bacillus* spp.

A Figura 2.9 ilustra o espectro de fragmentação do íon precursor 1058 Da, equivalente ao aduto de sódio da surfactina (C15) cuja massa é 1035 Da. Previamente a esse processo foi realizada a aquisição do espectro de MALDI TOF/TOF MS e a exatidão de massas para o íon estava de acordo com os valores esperados para o analisador de massas do tipo reflectron.

Nesse espectro é possível observar a perda sequencial dos resíduos de aminoácidos característicos das moléculas de surfactina. Primeiramente, é possível visualizar a perda de dois resíduos Iso/Leu, seguida pela perda de Ácido Aspártico e Valina e posteriormente a perda de mais dois resíduos de Iso/Leucina. Outras sequências que corroboram com a identificação da molécula de surfactina (C15) é a que inicia com a perda do resíduo de Valina, seguida pela perda de dois resíduos de Iso/Leu e por fim a perda de um resíduo de Ácido Glutâmico. Assim, conciliando os dados dos experimentos de fragmentação e a comprovação dos padrões condizentes com as moléculas, juntamente com os dados de exatidão dos espectros de alta resolução e exatidão e com o padrão isotópico previsto pelos softwares flexAnalysis e IsotopePattern, pode-se confirmar a presença desses metabólitos nos extratos dos *Bacillus* spp. LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202.

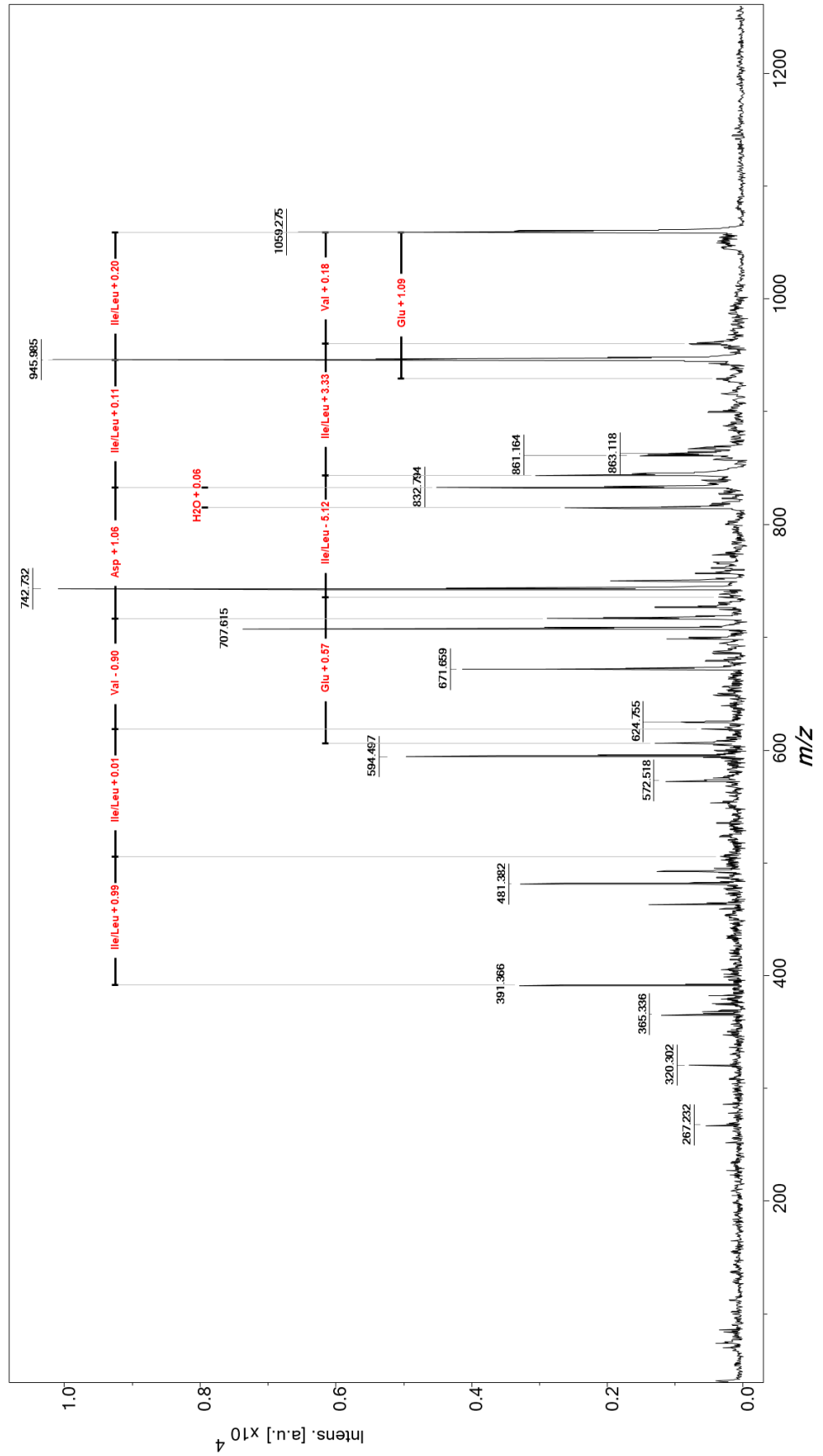


Figura 2.9. Ilustração da fragmentação CID do íon 1058 Da por MALDI-TOF MS/MS, oriundos das frações obtidas dos extratos das células dos isolados LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202.

As Figuras 2.10 e 2.11 representam o espectro de fragmentação do íon precursor 1354 Da, equivalente à Plantazolicina hidrolisada¹³⁰, tal metabólito apresenta massa de 1335 Da e ao hidrolisar um dos anéis oxazóis observa-se como resultado a molécula protonada cuja massa é equivalente a 1354 Da. Previamente a esse processo foi realizada a aquisição do espectro de MALDI TOF/TOF MS e a exatidão de massas para o íon estava de acordo com valores esperados para o analisador de massas do tipo reflectron.

Nesse espectro é possível observar que os processos de fragmentação ocorrem tanto pela porção N-terminal quanto pela porção C-terminal. No processo de fragmentação pela porção C-terminal observa-se a perda de um resíduo de fenilalanina resultando no íon de massa 1206 Da. A fragmentação pela porção N-terminal leva aos íons derivados de pirimidina, pirrolidina e cianamina, resultando respectivamente nos íons 157 Da, 140 Da e 112 Da.

Ainda iniciando-se pela porção N-terminal há perda da porção 4-dimetilamino-1-butilguanidina, seguida pelo deslocamento da carga formada no anel tiazol através o mecanismo de ressonância dos anéis oxazóis e tiazóis, Figura 2.12, levando a formação do íon 523 e, subsequentemente, aos íons 455 Da e 438 Da. Através da clivagem das ligações peptídicas com o aminoácido Isoleucina, na porção central da molécula, é observa-se a formação do íon de massa 648 Da.

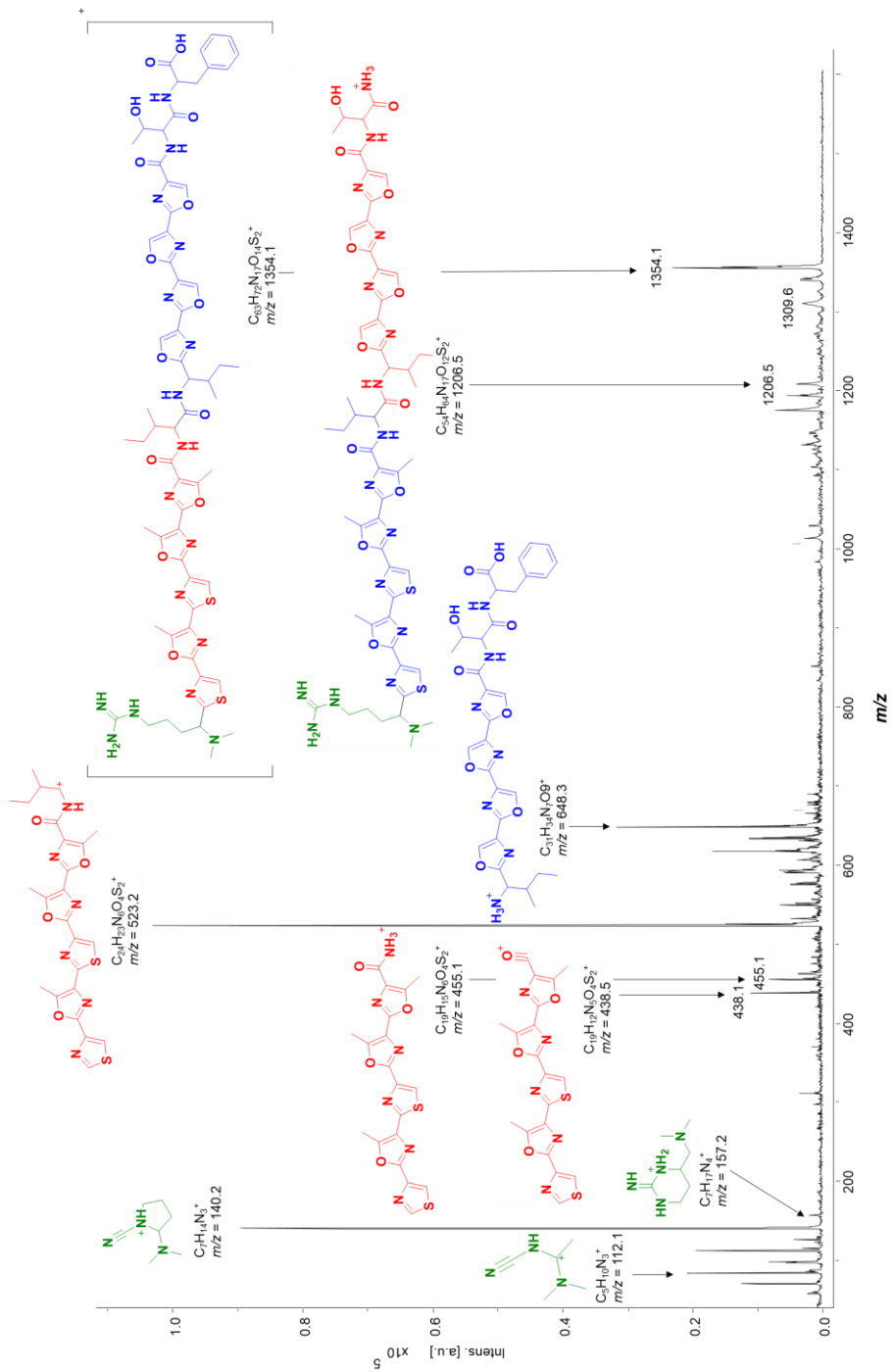


Figura 2.10 Ilustração da fragmentação CID do íon 1354 Da por MALDI-TOF MS/MS, dos extratos das células dos isolados LaBioMMi1137.

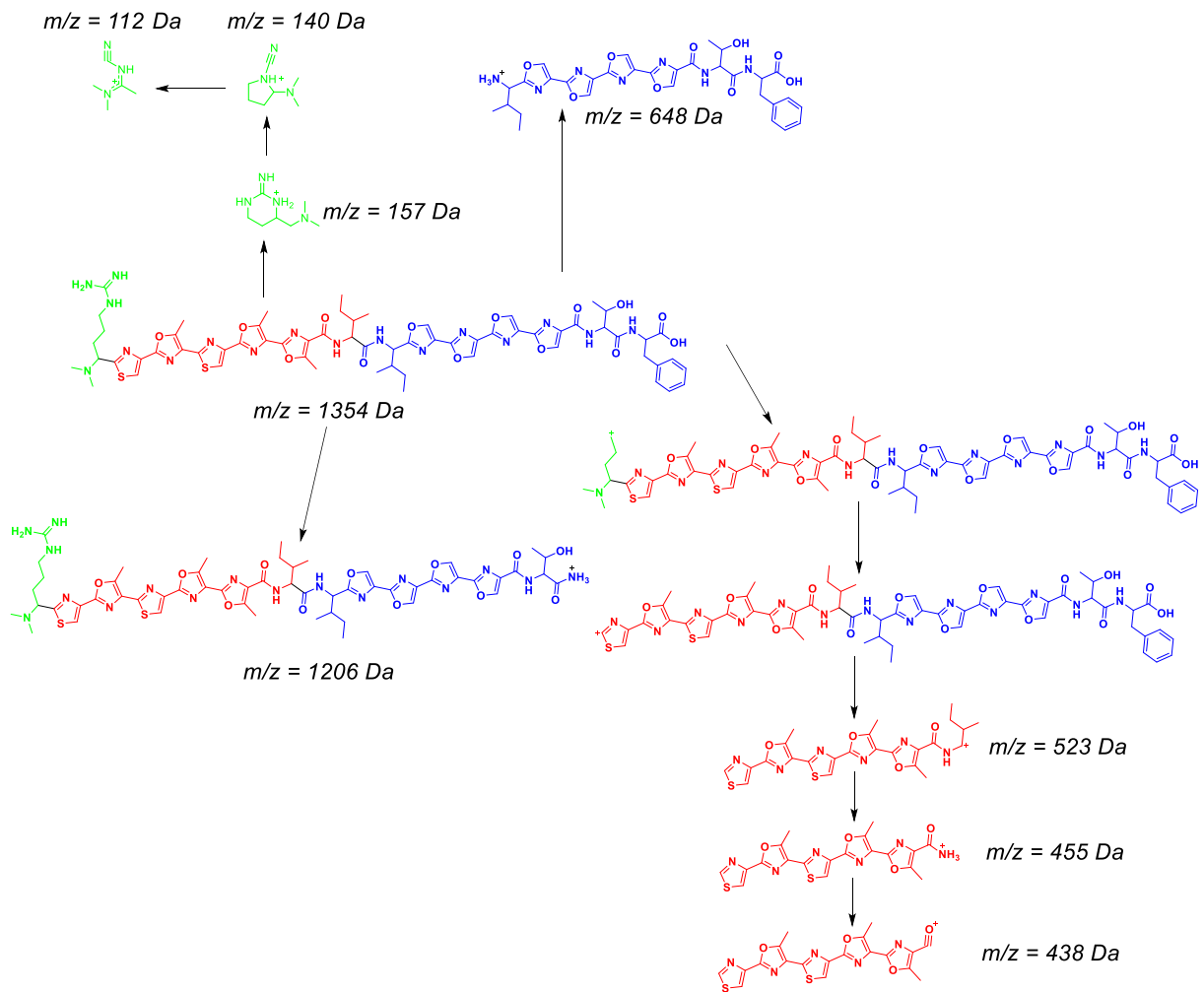


Figura 2.11. Esquema da fragmentação da Plantazolicina por CID.

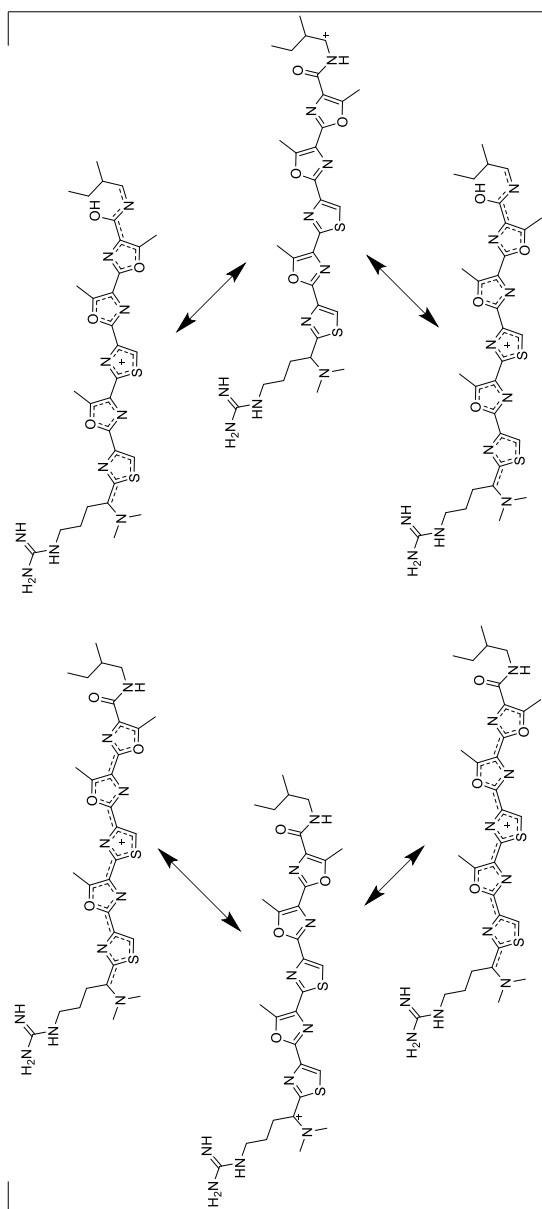


Figura 2.12. Esquema do sistema de ressonância dos anéis oxazóis e tiazóis.

A Figura 2.13 ilustra o padrão de fragmentação dos adutos de potássio das moléculas de fengicina isoladas a partir dos extratos dos isolados LaBioMMi 1180 e 1202. Previamente a esse processo foi realizada a aquisição do espectro de MALDI TOF/TOF MS e a exatidão de massas para o íon estava de acordo com valores esperados para o analisador de massas do tipo reflectron. Foram observadas diversas perdas sequenciais dos resíduos de aminoácidos característicos correspondentes da molécula de fengicina. Sendo que as maiores sequências de aminoácidos são, primeiramente, as perdas dos resíduos de prolina, valina, ácido glutâmico e treonina e a segunda sequência composta pelas perdas de valina, prolina, glutamina e tirosina, dessa forma caracterizando-se boa parte da estrutura de uma

fengicina. Ao se conciliar os dados dos experimentos de fragmentação e a comprovação dos padrões condizentes com as moléculas, juntamente com os dados dos de exatidão dos espectros de alta resolução e exatidão e com o padrão isotópico previsto pelos softwares flexAnalysis e IsotopePattern, pode-se confirmar a presença dessa molécula nos extratos dos *Bacillus* spp. LaBioMMi 1180 e 1202¹³⁰.

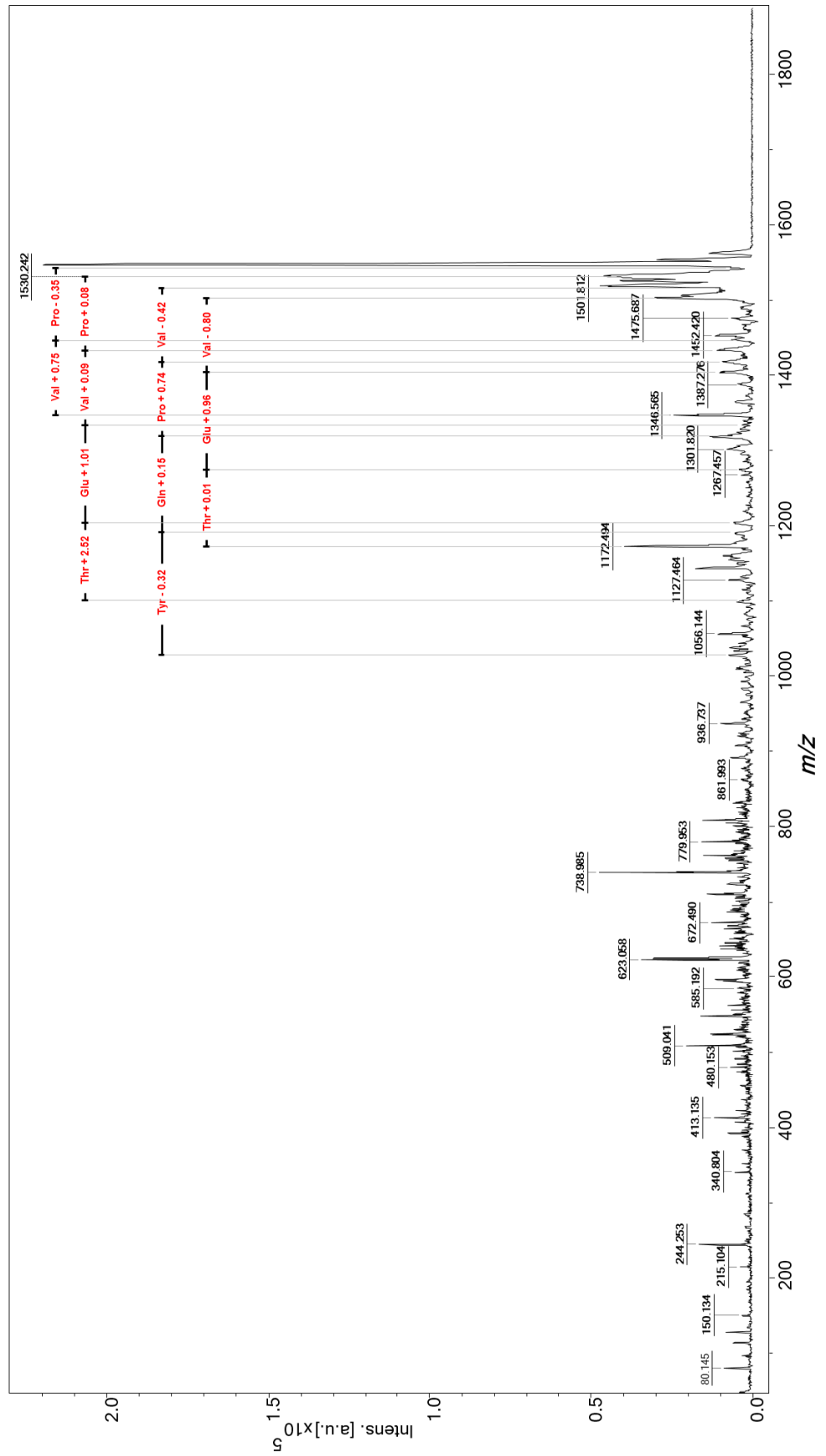


Figura 2.13. Espectros de fragmentação por CID das Fengicinas isoladas a partir dos extratos dos isolados LaBioMMi 1180 e 1202.

4.2 Avaliação dos perfil de compostos voláteis produzidos pelas cepas LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202 de *Bacillus* spp.

Vários meios de cultura foram empregados na avaliação do perfil de compostos voláteis produzidos pelas cepas LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202, sendo estas do gênero de microrganismos mais comumente isolados a partir da planta hospedeira *Podocarpus macrophyllus*, além de serem classificadas como bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPB). Esses perfis foram adquiridos, avaliados e comparados com o do óleo essencial, obtido a partir da hidrodestilação das folhas de *Podocarpus macrophyllus*, com a intenção de se verificar a existência de alguma correlação entre o perfil de compostos produzidos pela planta hospedeira e seus microrganismos endofíticos, bem como a produção de compostos que auxiliem o desenvolvimento da planta.

Não foi identificado nenhum composto, ou precursores de compostos, em comum no perfil de compostos voláteis da planta e de seus microrganismos endofíticos. A Figura 2.14 representa os cromatogramas obtidos a partir do hidrodestilado dos meios de cultura do isolado LaBioMMi 1180.

Foram observadas mudanças drásticas no número de picos nos cromatogramas, dependendo do meio de cultura no qual o microrganismo foi cultivado.

Analisando-se os dados da Figura 2.14 e das Tabela 2.7, 2.8 e 2.9 observa-se que nos meios minerais (1) e (2) o metabolismo secundário dessas bactérias foi mais ativo, havendo maior produção e diversidade de compostos voláteis. A relação dos compostos voláteis produzidos pelas demais cepas está descrita nas Tabela apêndice 4 e 12 do apêndice.

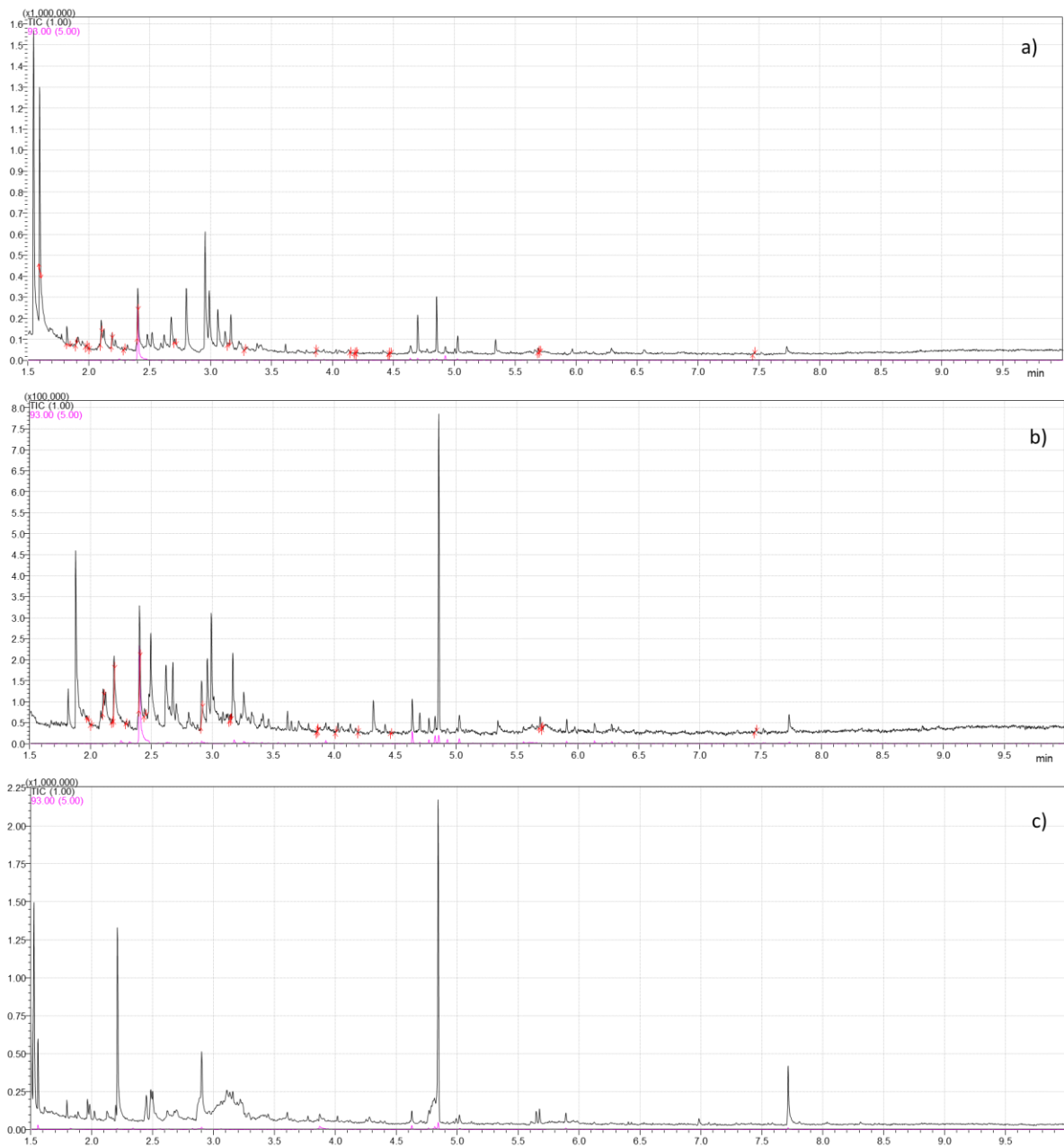


Figura 2.14. Comparação dos cromatogramas obtidos para os hidrodestilados dos meios de cultura do isolado LaBioMMi 1180, sendo a) meio (1), b) meio (2) e c) meio (3).

As Tabela 2.7, 2.8 e Tabela 2.9 ilustram o número e a diversidade de compostos produzidos pelo isolado LaBioMMi 1180, evidenciando o maior número de compostos quando esses microrganismos são cultivados nos meios de cultura (1) e (2). Um resultado semelhante foi observado para os demais isolados, nas quais as cepas LaBioMMi 1180 e 1202 foram as que apresentam maior diversidade, seja em número de compostos quanto em classes químicas.

Tabela 2.7. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*) no meio (1).

Nº	Nome	WT	Formula	Similaridade	RT	RI experimental	RI tabelado
1	3-metilpentan-2-ona	100	C ₆ H ₁₂ O	88	1.542	792	739
2	3-metilbut-2-en-1-ol	86	C ₅ H ₁₀ O	89	1.646	810	774
3	Butano-2,3-diol	90	C ₄ H ₁₀ O ₂	93	1.688	818	819
4	Ácido 2-hidroxiisobutírico	104	C ₄ H ₈ O ₃	88	1.749	830	867
5	2-hidroxipentan-3-ona	102	C ₅ H ₁₀ O ₂	89	1.782	836	821
6	Butana-1,3-diol	90	C ₄ H ₁₀ O ₂	75	1.812	842	815
7	2-metilpirazina	94	C ₅ H ₆ N ₂	84	1.855	850	852
8	2-metilpentan-1-ol	85	C ₆ H ₁₄ O	85	1.893	857	846
9	2-metilvalericoato	130	C ₇ H ₁₄ O ₂	81	1.940	865	853
10	1-isopropoxipropan-2-ol	118	C ₆ H ₁₄ O ₂	84	1.967	869	814
11	Putrescina	88	C ₄ H ₁₂ N ₂	83	1.976	871	930
12	1-etenilciclohex-1-eno	106	C ₈ H ₁₀	76	1.995	874	888
13	2-hidroxihexan-3-ona	87	C ₆ H ₁₂ O ₂	87	2.005	876	895
14	Etil-isobutil-carbonato	146	C ₇ H ₁₄ O ₃	74	2.032	880	896
15	1,2-dimetilpropiletanoato	130	C ₇ H ₁₄ O ₂	89	2.154	900	832
16	2-metiloctano	128	C ₉ H ₂₀	87	2.167	902	869
17	3-metilheptan-2-ona	128	C ₈ H ₁₆ O	89	2.235	916	883
18	Canfeno	136	C ₁₀ H ₁₆	95	2.432	955	953
19	Benzaldeído	106	C ₇ H ₆ O	90	2.493	966	961
20	1,3-dimetiltrissulfeto	126	C ₂ H ₆ S ₃	88	2.538	975	975
21	2-metiltetrahidrotiofen-3-ona	116	C ₅ H ₈ OS	81	2.634	992	990
22	2,2-dimetil-3-hexanil acetato	172	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	84	2.69	1001	990
23	Ácido 2-oxopentanóico	116	C ₅ H ₈ O ₃	88	2.81	1028	1011
24	2-(1-metilbutoxi)pentano	158	C ₁₀ H ₂₂ O ₂	91	2.97	1060	963
25	Diisoamil eter	158	C ₁₀ H ₂₂ O ₂	84	3.00	1066	1002
26	4-metildecano	156	C ₁₁ H ₂₄	84	3.07	1080	1051
27	2-metildecano	156	C ₁₁ H ₂₄	85	3.12	1090	1051
28	Hexadecano	226	C ₁₆ H ₃₄	90	3.17	1099	1100
29	Tridecan-2-ona	198	C ₁₃ H ₂₆ O	84	5.03	1571	1494
30	Tetradecan-2-ona	212	C ₁₄ H ₂₈ O	89	5.34	1636	1597

Tabela 2.8. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*) no meio (2).

Nº	Nome	WT	Formula	Similaridade	RT	RI experimental	RI tabelado
1	3-metilpentan-2-ona	100	C ₆ H ₁₂ O	95	1.51	788	750
2	2-metiltioetanol	92	C ₃ H ₈ OS	83	1.54	791	813
3	3-metilbut-2-en-1-ol	86	C ₅ H ₁₀ O	93	1.61	802	781
4	Ácido 2-etilbutanóico	116	C ₆ H ₁₂ O ₂	85	1.91	860	845
5	2-metilhexan-5-ona	114	C ₇ H ₁₄ O	98	1.97	870	835
6	Etilbenzeno	106	C ₈ H ₁₀	88	1.99	873	871
7	3-metilhexan-2-ol		C ₇ H ₁₆ O	90	2.02	878	906
8	O-Xileno	106	C ₈ H ₁₀	91	2.03	880	888
9	Oct-1-en-3-ol	128	C ₈ H ₁₆ O	86	2.11	892	942
10	Octan-2-one	128	C ₈ H ₁₆ O	85	2.13	896	993
11	3-metil-2-butilacetato	130	C ₈ H ₁₄ O ₂	87	2.14	897	850
12	Nonano	128	C ₉ H ₂₀	95	2.17	903	900
13	3-metiltiopropionaldeído	104	C ₄ H ₈ OS	90	2.21	910	910
14	2,5-Dimetilpirazina	108	C ₆ H ₈ N ₂	96	2.23	914	916
15	Canfeno	136	C ₁₀ H ₁₆	93	2.43	954	953
16	Benzaldeído	106	C ₇ H ₆ O	82	2.49	966	961
17	5-metilheptan-2-ona	128	C ₈ H ₁₆ O	90	2.51	969	971
18	2-metiltetrahidrotiofen-3-ona	116	C ₅ H ₈ OS	80	2.63	991	947
19	Decano	142	C ₁₀ H ₂₂	85	2.69	1001	1000
20	2,3,5-trimetilpirazina	122	C ₇ H ₁₀ N ₂	86	2.71	1006	999
21	Fenilacetaldéido	120	C ₈ H ₈ O	86	2.92	1050	1049
22	2-Metildecano	156	C ₁₁ H ₂₄	82	2.97	1060	1065
23	Ácido Isopropilpiruvico	130	C ₆ H ₁₀ O ₃	87	3.17	1100	1046
24	2-feniletanol	122	C ₈ H ₁₀ O	86	3.26	1121	1120
25	1-fenilacetona	134	C ₉ H ₁₀ O	83	3.32	1135	1124
26	Decan-2-ona	170	C ₁₀ H ₂₀ O	82	3.46	1166	1190
27	2-Butiloctan-1-ol	186	C ₁₂ H ₂₆ O	87	3.62	1200	1201
29	beta-Farneseno	204	C ₁₅ H ₂₄	88	4.64	1461	1444
30	Pentadecan-2-ona	254	C ₁₅ H ₃₀ O	88	5.34	1665	1656
31	Pentadecan-2-ol	256	C ₁₇ H ₃₆ O	90	5.37	1673	1675
32	Farnesol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	94	5.57	1735	1734
33	Hexadecan-2-ona	282	C ₁₉ H ₃₈ O	89	5.59	1743	1778
34	Hexadecan-2-ol	284	C ₁₉ H ₄₀ O	90	5.72	1783	1774
35	Heptadecan-2-ona	282	C ₁₉ H ₃₈ O	83	5.97	1867	1868
36	Heptadecan-2-ol	284	C ₁₉ H ₄₀ O	85	6.00	1876	1873

Tabela 2.9. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*) no meio (3).

Nº	Nome	WT	Formula	Similaridade	RT	RI experimental	RI tabelado
1	Norcanfeno	96	C ₇ H ₁₂	84	1.517	789	777
2	1-metilsulfínietileno	90	C ₃ H ₆ OS	82	1.531	791	781
3	Tolueno	92	C ₇ H ₈	90	1.564	795	787
4	2-metilpentanal	100	C ₆ H ₁₂ O	86	1.967	869	791
5	Feniletano	106	C ₈ H ₁₀	82	1.984	872	864
6	P-Xileno	106	C ₈ H ₁₀	71	2.022	879	888
7	3-metilmercaptopropionaldeído	104	C ₄ H ₈ OS	94	2.195	908	909
8	2,5-dimetilpirazina	108	C ₆ H ₈ N ₂	93	2.211	912	912
9	6-metilheptan-2-ona	128	C ₈ H ₁₆ O	89	2.447	958	957
10	Benzaldeído	106	C ₇ H ₆ O	76	2.484	965	961
11	5-metilheptan-2-ona	128	C ₈ H ₁₆ O	81	2.5	968	965
12	1,3-dimetiltrissulfeto	126	C ₂ H ₆ S ₃	84	2.526	972	972
13	Fenilacetaldéido	120	C ₈ H ₈ O	92	2.902	1058	1049
14	4-Metildec-1-ene	154	C ₁₁ H ₂₂	89	3.107	1064	1041
15	n-Undecano	156	C ₁₁ H ₂₄	91	3.158	1147	1036
16	Hexadecan-2-one	282	C ₁₉ H ₃₈ O	91	5.649	1761	1800
17	Hexadecan-2-ol	284	C ₁₉ H ₄₀ O	84	5.674	1769	1774
18	Farnesol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	87	5.892	1757	1734

A análise do perfil dos compostos presentes no cromatograma dos hidrodestilados das cepas LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202 demonstrou que tais bactérias são hábeis produtoras de compostos nitrogenados, sulfurados, ácidos, álcoois e cetonas de cadeia curta. As pirazinas constituem a principal classe de compostos presentes no perfil de compostos voláteis produzidos por esses isolados. Os compostos voláteis metilpirazina e 2,5-dimetilpirazina foram produzidos pelos isolados avaliados, independentemente do meio de cultura utilizado. Também foram identificados os compostos 2-etil-3-metilpirazina; 3,5-dimetil-2-etilpirazina; 2,3,5-trimetilpirazina e 2,3,5,6-tetrametilpirazina.

Os compostos derivados das pirazinas encontram-se próximos do tempo de retenção de 3.0 minutos, sendo possível visualizar a intensidade dos picos referentes a esses compostos, demonstrando que são majoritários no perfil de compostos voláteis dessas bactérias. Essa classe de compostos está comumente presente na composição do aroma de cacau e chocolate, Tabela 2.10. O que torna a

capacidade da síntese dessas substâncias de grande interesse para a indústria de flavorizantes¹³¹.

Tabela 2.10. Constituintes comumente relatados na composição do aroma de cacau e chocolate, e o atributo sensorial relatado para cada composto¹³¹.

	Composto	Atributo sensorial
Aldeídos	2-Metilpropanal	Chocolate
	2-Metilbutanal	Chocolate
	3-Metilbutanal	Chocolate
	2-fenil-2-butenal	Cacau torrado
	4-metil-2-fenil-2-pental	Cacau
	5-metil-2-fenil-2-hexenal	Cacau
Pirazina	2-metilpirazina	Noz, Cacau
	2-etil-5-metilpirazina	Cacau torrado
	2,3-dimetilpirazina	Caramelo, cacau
	2,3-dimetil-5-etilpirazina	Cacau, chocolate
	2,5-dimetilpirazina	Cacau, nozes torradas
	3,5-dimetil-2-etilpirazina	Cacau, chocolate
	2,3,5-trimetilpirazina	Cacau, nozes
	2,3,5,6-tetrametilpirazina	Cacau, café
	3,5-dietil-2-metilpirazina	Cacau, chocolate

Tradicionalmente, as principais fontes para extração de flavorizantes naturais são materiais crus, como por exemplo: carnes, frutas, folhas, ervas e sementes. Porém existem alguns problemas inerentes ao uso de tais fontes de matéria prima, como a disponibilidade dessas *comodities*, que é influenciada pela sazonalidade, de forma que oscilações na sua disponibilidade dela afeta diretamente o custo de aquisição da matéria prima.

Além disso, outros fatores como o processo de extração dos compostos, a variabilidade na quantidade e qualidade da mesma, são fatores que tornam a obtenção desses aromas mais onerosa, de tal forma que pode provocar irregularidades no suprimento do mercado.

Diante disso, processos bioquímicos para a produção de substâncias flavorizantes naturais são interessantes a tal ponto que a *International organization of the Flavor Industry* (IOFI), lista a uso de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, células animais e vegetais, e enzimas, na produção de substâncias flavorizantes através de processos bioquímicos¹³².

Em ambas as condições de cultivo, os isolados LaBioMMi 1180 e 1202 apresentaram a 2-metil-3-tiolanona como principal produto sulfurado, sendo produzida em todas as condições de crescimento avaliadas para essas bactérias. Além disso, na condição de crescimento utilizando o meio de cultura (2) uma maior gama de compostos contendo enxofre foi observada no perfil de compostos voláteis das bactérias, sendo que para o isolado LaBioMMi 1180 foram identificados os compostos 2-metiltioetanol e 3-metiltiopropionaldeído. Já para o isolado LaBioMMi 1202, os compostos 1-(metilsulfenil)etileno, 2-metiltioetanol e 3-metiltiopropionaldeído foram identificados. Além desses compostos, vale destacar a produção de dimetiltrisulfeto.

A associação de bactérias produtoras de compostos sulfurados a suas plantas hospedeiras podem ser bastante benéfica para o desenvolvimento e proteção das plantas. Em 2015, Tyc et al.¹³³ demonstraram por meio da interação de microrganismos, que os voláteis bacterianos inibiram significativamente o crescimento dos fungos testados. Tal resultado foi atribuído à presença de compostos sulfurados no perfil de voláteis das bactérias. De fato, compostos voláteis como 1,2-dimetildisulfeto e 1,3-dimetiltrisulfeto são descritos como compostos fungistáticos capazes de inibir o desenvolvimento de diversos fungos^{91,134-138}.

Adicionalmente, o processo de defesa da planta pode ocorrer por meio da comunicação entre organismos utilizando compostos voláteis como moléculas sinalizadoras. Um exemplo é a herbácea *Brassica nigra* com suas raízes infestadas por larvas de *Delia radicum* podem ser defendidas pela emissão de VOCs, como metanotiol, dimetilsulfeto (DMS), dimetildisulfeto (DMDS) e dimetiltrisulfeto (DMTS). Tais compostos funcionam como moléculas sinalizadoras e atraem besouros que vivem no solo, que predam as larvas da raiz.

Também foi demonstrando por Vrieze et al.¹³⁹ que compostos voláteis produzidos por *Pseudomonas infestans* associada à batata produzem compostos voláteis com potencial atividade como agente anti-oomycetos. O gênero protista *Phytophthora*, que englobam microrganismos nocivos à agricultura e silvicultura, têm seu desenvolvimento afetado quando exposto ao DMDS e DMTS.

Embora esses compostos sejam metabolitos presente no perfil de voláteis de *Pseudomonas infestans*, os autores levantaram alguns problemas na utilização desses compostos como biomarcadores em cepas controle, pois para se

determinar a eficácia dos voláteis produzidos por essa cepa, seria necessário a quantificação do efeito e concentração de cada componente presente no perfil.

Assim a associação desses conjuntos de dados juntamente com os efeitos inibitórios poderia ajudar a determinar estatisticamente a contribuição de cada componente na ação inibitória sinérgica do volátiloma. Além da capacidade inibitória do crescimento de patógenos, a emissão de DMDS e DMTS atua como promotor do crescimento.

Meldau et al.¹⁴⁰ caracterizaram o perfil de compostos voláteis emitido pela cepa de *Bacillus sp. B55*, e o DMDS estava presente em grande concentração. Contudo, alterações na concentração desse composto foram observadas segunda as condições de cultivo. Quando o *Bacillus B55* era cultivado sozinho o DMDS era muito mais abundante do que quando o co-cultivado juntamente com plântulas de *Nicotiana attenuata* selvagens. Testes adicionais demonstraram que o tratamento das plântulas com DMDS puro promoveu o seu crescimento.

Quando cultivado no meio de cultura (2), o isolado LaBioMMi 1180 produziu alguns compostos ácidos carboxílicos como: ácido 2-etilbutírico; ácido alfa-hidroxi-butírico, ácido 3-oxovalérico, e os ésteres acetato de isoamila e piruvato de isopropila. Tanto o benzaldeído quanto o fenilacetaldéido foram outros compostos voláteis comuns no perfil produzido pelos isolados avaliados.

Ao menos um desses compostos foi produzido em alguma das condições experimentais avaliadas. Apenas o isolado LaBioMMi 1180, quando cultivado no meio de cultura (1), produziu um maior número de compostos benzênicos, sendo o etilbenzeno, o-xileno, 2-feniletanol e fenilacetona. O isolado LaBioMMi 1180, quando cultivado no meio cultura (2), foi capaz de produzir as seguintes cetonas de cadeia longa 2-decanona; 2-pentadecanona; 2-hexadecanona; 2-heptadecanona e os álcoois de cadeia longa 2-pentadecanol; 2-hexadecanol; 2-heptadecanol.

De maneira semelhante, quando cultivado nas mesmas condições, o isolado LaBioMMi 1141 produziu as cetonas de cadeia longa 2-tridecanona e 2-hexadecanona. Os isolados LaBioMMi 1137 e 1202 produziram o 8-heptadecanol, mas diferentemente das demais bactérias, a biossíntese dessa molécula ocorreu quando foram cultivadas no meio de cultura (1). A Figura 2.15 ilustra alguns compostos identificados no perfil de compostos voláteis produzidos por *Bacillus spp.*

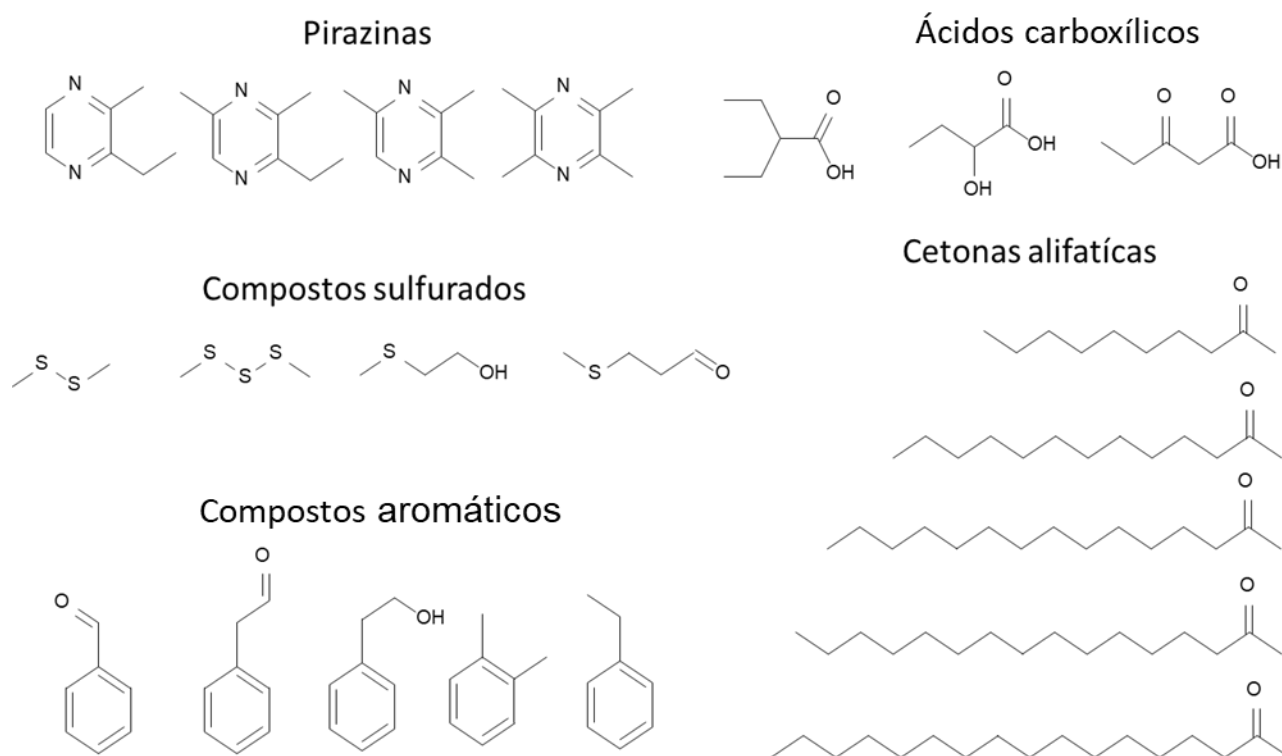


Figura 2.15 Estruturas dos compostos voláteis encontrados no perfil das cepas de LabioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202.

A vastidão da complexidade de interações promovidas por compostos voláteis produzidos por microrganismos, plantas, insetos e outros seres vivos ainda possui muitas informações a serem descobertas, dada a quantidade de compostos e organismos interagindo entre si. Além dos compostos mencionados anteriormente, outros VOCs microbianos apresentam propriedades antibióticas e indicam que existem processos mediadores entre as interações.

Como exemplo, pode-se citar alguns compostos oxigenados como o benzaldeído que exibe forte atividade antifúngica no solo, mesmo em baixíssimas concentrações¹⁴¹. Outros compostos oxigenados bioativos como a 2-undecanona e 2-tridecanona apresentam atividade contra as espécies de lagartas de *Manduca sexta*, *Keiferia lycopersicella* e *S. exigua*¹⁴².

As cetonas 2-heptanona, e 3-octanona não demonstraram efeitos significantes aos nematoides *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incógnita*. Contudo, a 2-undecanona foi a mais ativa, com resposta de $EC_{50} = 22.6$ e 20.6 mg/L para cada espécie, respectivamente. Tais compostos são constituintes do perfil de voláteis de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, como por exemplo o *Bacillus megaterium* YMF3.

Além das cetonas citadas, outros voláteis como classes álcoois, aldeídos, cetonas, alquenos, éteres também foram detectados como metabólitos de bactérias presentes no solo, com atividade nematocida *Panagrellus redivivus* e *Bursaphelenchus xylophilus*. Adicionalmente, a detecção de metilcetonas C11 e C13, 2-undecanona e 2-tridecanona, nas em raízes de diversas plantas corroboram a hipótese da ação dessas moléculas como agentes de defesa^{141,143}.

Também se observa a produção de terpenoides ao se avaliar o perfil de compostos voláteis produzidos pelas bactérias sobre diferentes condições de cultivo. Em ambas as condições de cultivo, foi possível constatar a produção do hemiterpeno 3-metil-2-buten-1-ol (Prenol) pelo isolado LaBioMMi 1180 quanto pelo isolado LaBioMMi 1202. A partir desse ponto, o metabolismo desses isolados diverge quanto à produção de composto terpenoides nos experimentos de cultivo. A Figura 2.16 ilustra a estrutura dos compostos identificados, quando o isolado LaBioMMi 1180 foi cultivado no meio de cultura (1), produzido não apenas o monoterpene canfeno. Quando cultivado no meio de cultura (2) além do canfeno também foi possível identificar a produção do beta-farneseno.

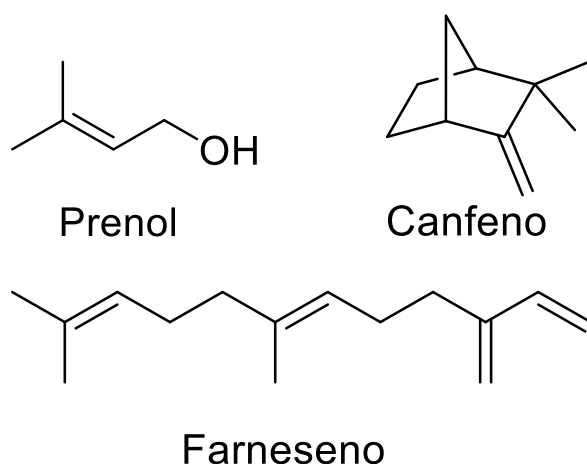


Figura 2.16. Terpenoides produzidos pelo isolado LaBioMMi 1180.

O isolado LaBioMMi 1202 demonstrou-se um produtor mais hábil de terpenoides. Em seu perfil químico foi possível a identificação de diversos sesquiterpenos. Nas condições de cultivo do meio de cultura (2), foram produzidos os sesquiterpenos beta-farneseno, trans-farnesol e D-nerolidol. A estrutura desses compostos está ilustrada na Figura 2.17.

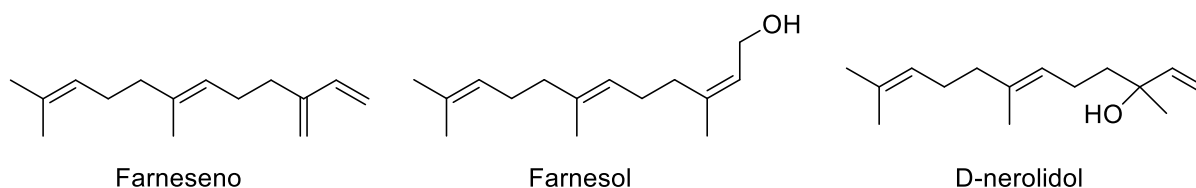


Figura 2.17. Estrutura química dos terpenoides produzidos pelo isolado LaBioMMi 1202 quando cultivado no meio de cultura 1.

Entretanto, quando cultivado nas condições de cultivo, utilizando o meio de cultura (1), o isolado LaBioMMi 1202 demonstrou-se um hábil produtor de sesquiterpenos, onde diversos compostos puderam ser identificados em seu perfil de compostos voláteis. Nessa condição foram identificados os compostos: alfa-bergamoteno, alfa-zingibereno, beta-sesquifelandreno e os sesquiterpenos oxigenados: D-nerolidol, alfa-Bisabolol, trans-farnesol, bulnesol, cedr-8(15)-en-9-ol, 2-

metil-5-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2,3-pentanodiol, como pode ser visualizado na Figura 2.18.

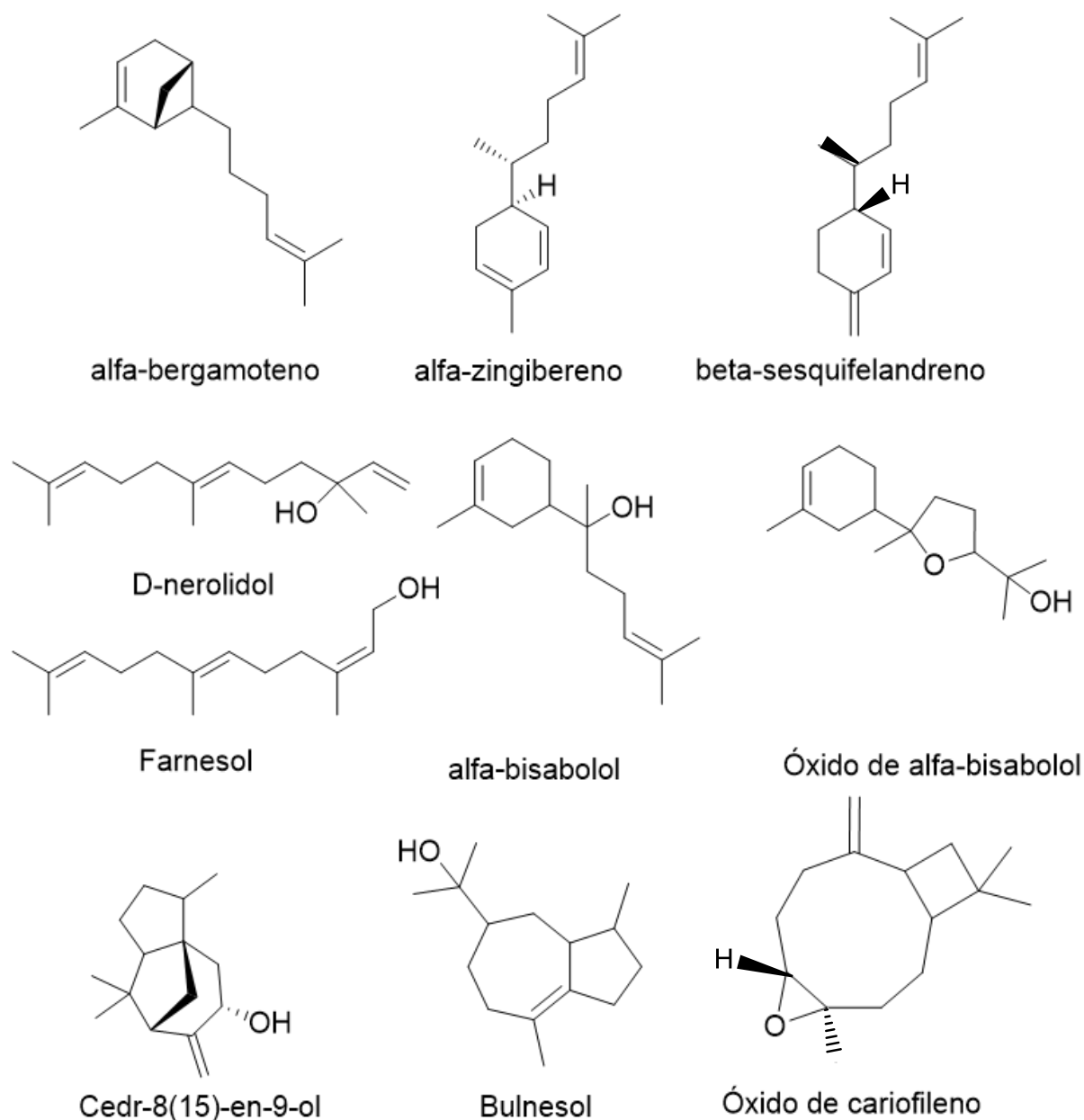


Figura 2.18 Estruturas dos compostos terpenóides produzidos pelo isolado LaBioMMi 1202 quando cultivado no meio de cultura 1.

Embora não se tenha observado correlação entre o perfil de voláteis produzidos pelos isolados LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202 com o perfil do óleo essencial do *Podocarpus macrophyllus*, ainda assim a produção de alguns terpenoides foi observada nesses isolados. A importância do papel dos voláteis nas interações entre as bactérias presentes no solo foi avaliada por Gaberva et. al¹⁴⁴ através do monitoramento dos compostos voláteis emitidos, por 4 isolados

bacterianos filogeneticamente diferentes: *Collimonas pratensis*, *Serratia plymuthica*, *Paenibacillus* sp. e *Pedobacter* sp. frente a *Pseudomonas fluorescens*. Dentre as cepas avaliadas, destaca-se a *C. pratensis* cujos metabolitos induziram o crescimento de *Pseudomonas fluorescens*, diferenças na resposta de mobilidade e indução de resposta ao estresse oxidativo e a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana.

Posteriormente, seis cepas de *Collimonas* tiveram seu genoma estudado por Song et. al¹⁴⁵ com o intuito de se encontrar possíveis clusters envolvidos com a biossíntese de terpenos, e em todas elas foram encontrados genes relacionados à biossíntese de precursores envolvidos na rota dos carotenoides.

Em duas cepas de *C. pratensis* os genes CPter91_2617 e CPter291_2730, relacionados a terpeno sintases, foram encontrados. Após clonagem e expressão em *E. coli*, as enzimas foram testadas frente aos substratos FPP, GPP e GGPP para avaliar a conversão dos mesmos em terpenos e foi observada a produção de β -pinene e β -linalool.

Tais enzimas também demonstraram a capacidade de converter os precursores FPP e GGPP a terpenoides. O FPP foi convertido a uma mistura sesquiterpenos e alcoóis sesquiterpênicos, sendo que o composto majoritário dessa mistura foi Germacrenol. Além disso, uma série de compostos minoritários foi produzida durante a reação como o δ -cadineno. Quando avaliadas frente o precursor GGPP observou-se que uma pequena fração era convertida em um composto terpenoide identificado como 13-epimanool.

Sequências de DNA relacionadas às terpeno ciclases são comumente encontrados em procaríotos. Contudo, actinomicetos são majoritariamente caracterizados como hábeis produtores de terpenoides^{146,147}. Em 1994 Guertler et. al⁹³ relataram a produção de um sesquiterpeno α,β -insaturado isolado a partir de *Streptomyces albidoflavus*. Este composto terpenoide era uma cetona com esqueleto em zizaeno e foi nomeada como Albaflavenona.

Posteriormente, Takmatsu et. al⁹⁴ propôs a rota biossintética da produção de compostos derivados da albaflavenona por *S. avermitilis*. Nessa bactéria o gene, que estava silenciado, sav3032 foi encontrado e codifica a produção de uma epi-izozizaeno sintase. Após a ativação e coexpressão do sav3032 com o sav3031 foi identificada a produção de epi-izozizaeno, juntamente com os produtos de oxidação desse precursor, os albaflavenois e a albaflavenona. Um novo

metabolito foi relatado para nesse experimento, para tanto foi necessária a coexpressão do sav3031 juntamente com gene CYP170 A2 (citocromo P450) ou sav1745 (epoxidase). A produção do 4 β ,5 β -epoxi-2-epi-zizaan-6 β -ol foi obtida após um processo de epoxidação do albaflavenol seguido de um rearranjo. Zheng et. al¹⁴⁸ também isolaram compostos derivados do epi-izozizaeno a partir de uma espécie de *Streptomyces*. Um novo sesquiterpeno tricíclico denominado de albaflavenoil e albaflavenol B foram isolados de uma cepa de *S. violascens*. A atividade citotóxica de ambos com compostos foi testada frente a *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, mas não apresentaram atividade biológica até a concentração de 100 μ g ml⁻¹. Braña et. al⁹⁵ identificou os sesquiterpenos, β -patchouleno e dihidro- β -agarofurano, com produção que nunca havia sido reportada para bactérias. Sendo o β -patchouleno de interesse comercial para a indústria de perfumaria e o dihidro- β -agarofurano com forte potencial biológico por apresentar atividades antitumoral, anti-HIV, imunossupressora, atividade inseticida.

Em 1993 Hefter et. al¹⁴⁹ relatam o primeiro diterpenóide da classe dos verrucosanos produzido por um procarionto. Foi isolado dois diterpenos com um sistema de anéis 3,6,6,5-tetracíclico da bactéria *Chloroflexus aurantiacus*, um foi identificado com (-)-verrucosan-2 β -ol e o outro terpenóide apresentava o mesmo esqueleto carbônico e uma insaturação. Os autores atribuem grande importância a descoberta desse metabolito e a relação quimiotaxonômica dos procariontos, a presença da (-)-verrucosan-2 β -ol e a ausência de hopanóides pode significar que a *C. aurantiacus* está num estágio evolutivo, em termos de evolução bioquímica, anterior aos demais procariontos produtores de hopanóides. Um novo diterpeno tricíclico foi descoberto a partir do extrato lipídico de *Rhodospirillum rubrum* em 1995 por Chuck et. al¹⁵⁰. A coleção de diterpenóides da classe dos verrucosanos aumentou em 2003 quando Spere et. al¹⁵¹ descobriram 4 novos metabolitos dessa classe produzidos (Neoverrucosan-5 β ,9 β -diol, Neoverrucosan-5 β ,18 β -diol, Neoverrucosan-5 β ,9 β ,18 β -triol, Neoverrucosan-5 β ,9 β -diol-4-carboxaldehyde) pela bactéria marinha *Saprospira grandis*. Embora a *C. aurantiacus*, *S. grandis* e *R. rubrum* colonizem nichos distintos e conseqüentemente apresentem diferenças fisiológicas e filogenéticas, em todos os casos a função dessas classes de metabolitos foi associada a modulação da fluidez da membrana celular. Além disso, tais bactérias são exemplos de regulação bioquimicamente mais primitivas que a utilização de hopanóides, haja visto que

biossíntese dos mesmos requer a biossíntese de geranilgeraniol, ao invés de esqualeno, como percussores de sua biossíntese^{150,151}.

4.3 Experimento de interação de crescimento entre o isolado LabioMMi 1180 e fungos endofíticos de *Podocarpus macrophyllus*.

Os experimentos de interação entre microrganismos foram realizados utilizando-se co-culturas de microrganismos em placa de Petri com o intuito de investigar se os metabólitos derivados da bactéria *B. subtilis* poderiam afetar o crescimento dos fungos *Xylaria* sp., *Trichoderma* sp. e *Cladosporium* sp.

Os microrganismos foram inoculados em cada canto da placa de Petri e o crescimento radial dos fungos foi monitorado durante 14 dias de incubação e, no final do experimento, a área ocupada pelo crescimento dos fungos foi determinada. Neste tipo de ensaio, os compostos orgânicos voláteis (VOCs) liberados pelos dois organismos são confinadas no espaço da placa, e os metabólitos fixos estão difundidos através do meio de cultura. O meio de cultivo generalista BDA, que promove rápido crescimento radial, e o meio R2A oligotrófico foram utilizados.

As interações entre fungos e bactérias podem seguir diferentes mecanismos. Embora não seja tão fácil determinar exatamente o que causa a inibição e seu funcionamento, a observação do desenvolvimento de colônias do microrganismo inibido pode fornecer algumas pistas sobre o mecanismo e quais os tipos de metabólitos envolvidos no processo de inibição.

Nas partes superiores e inferiores da Figura 2.19, é possível visualizar que a massa micelial do *Cladosporium* sp. cresce na placa de teste com quase a mesma geometria que o controle, mostrando apenas uma pequena assimetria. Pode indicar que talvez esta cepa de *Cladosporium* seja mais sensível aos VOCs produzidos por *B. subtilis*. Contudo, o crescimento de *Xylaria* sp. e do *Trichoderma* sp. apresenta maior assimetria. O crescimento assimétrico desses fungos ocorreu diretamente na face exposta ao *B. subtilis*, tal comportamento sugere a presença de um gradiente de difusão de metabólitos bioativos produzidos pela bactéria, que inibindo o crescimento invasivo dos fungos.

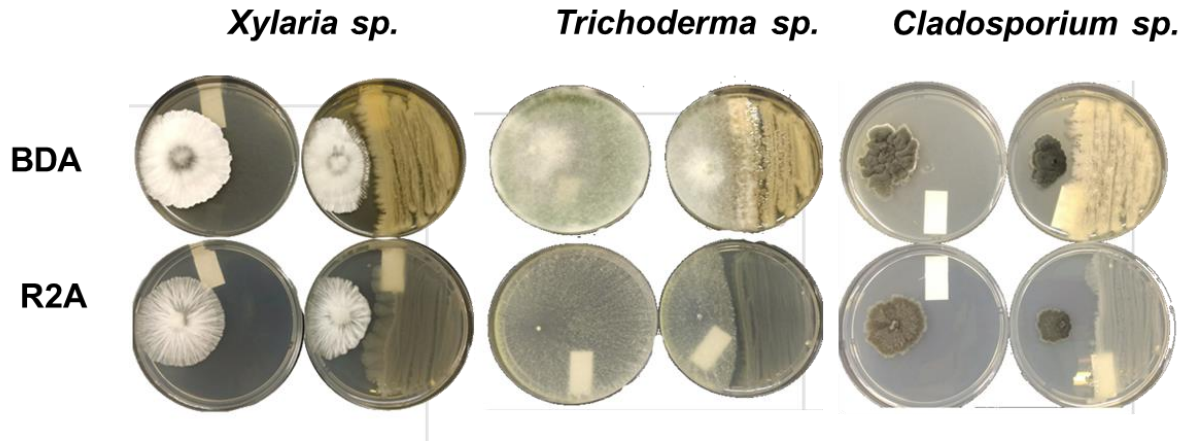


Figura 2.19. Experimento de interação entre isolados LaBioMMi 1180 e nos fungos *Xylaria sp.*, *Trichoderma sp.* e *Cladosporium sp.*

As áreas de crescimento medidas nos experimentos e nos controles geraram gráficos, Figura 2.20 e 2.21, nas quais, observar-se que em todos os experimentos a presença do *B. subtilis* inibiu significativamente o crescimento de fungos *Xylaria sp.*, *Trichoderma sp.* e *Cladosporium sp.* em ambos os meios de cultura avaliados.

A área ocupada pela *Xylaria sp.* foi reduzida de 2033 mm² (controle) para 1474 mm² no meio BDA e de 1905 mm² para 589 mm² em R2A, quando cultivado na presença do LaBioMMi 1180.

O mesmo comportamento foi observado para os demais fungos. A área ocupada por *Cladosporium sp.* reduziu de 1098 mm² (controle) para 494 mm², quando cultivado em BDA e de 623 mm² para 248 mm² quando cultivado em R2A.

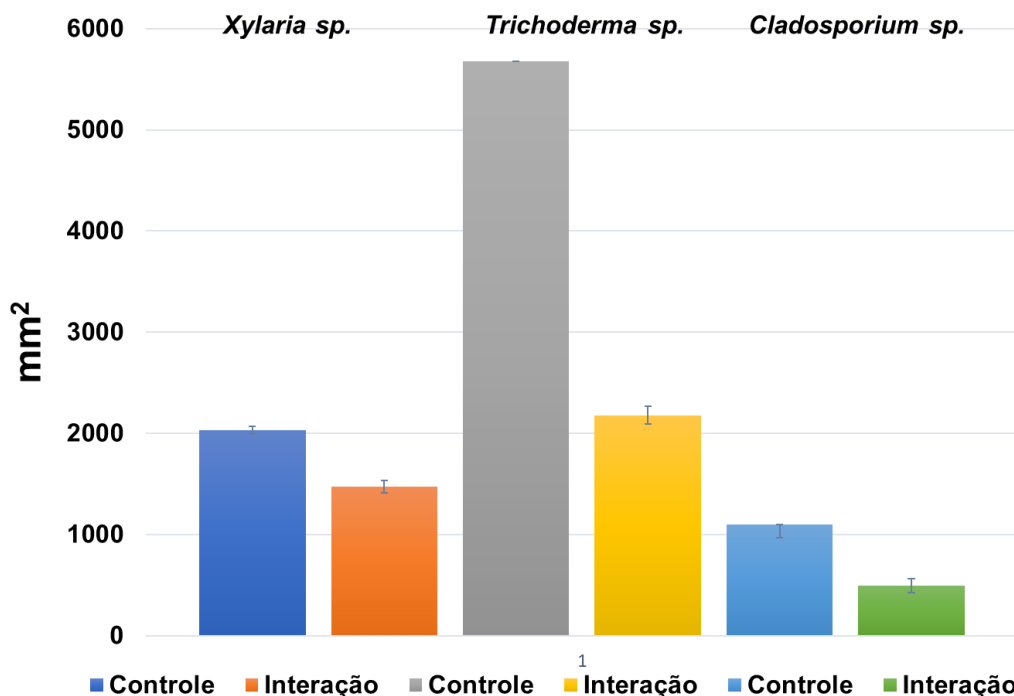


Figura 2.20. Alteração da área de crescimento dos fungos em meio BDA quando em contato com o isolado LaBioMMi 1180.

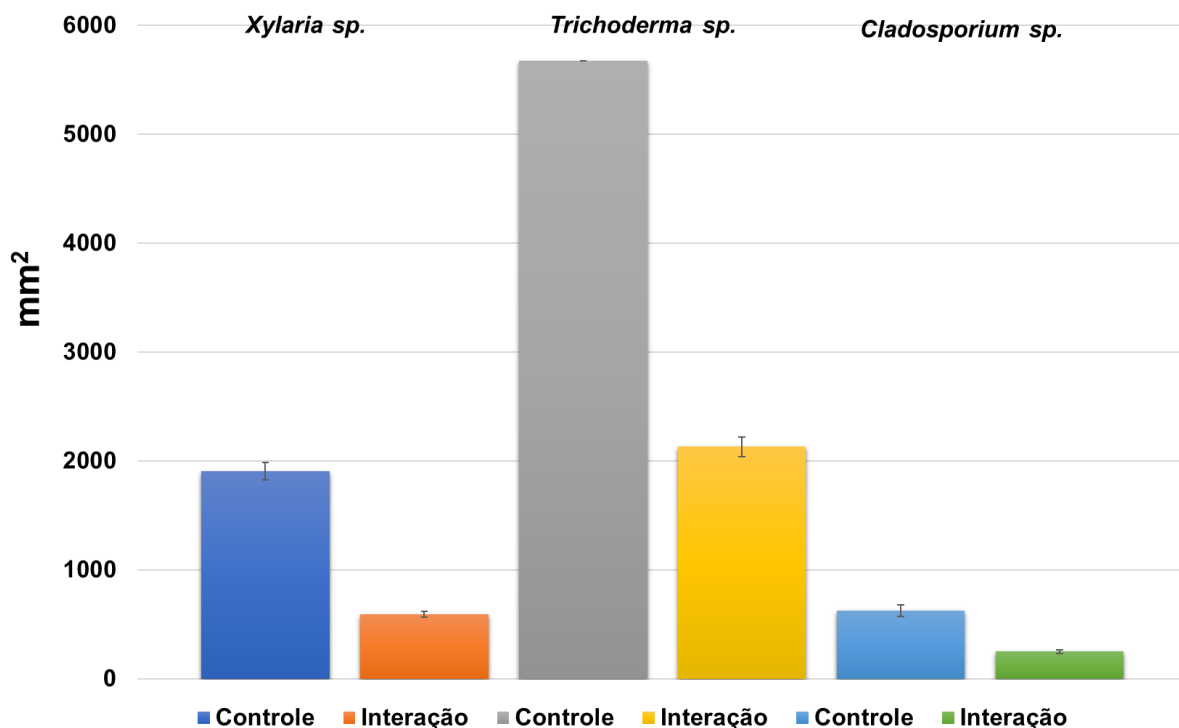


Figura 2.21 Alteração da área de crescimento dos fungos em meio R2A quando em contato com o isolado LaBioMMi 1180.

As bordas das colônias dos microrganismos envolvidos nos experimentos de co-cultivo foram retiradas e um processo de microextração foi realizado. Na Figura 2.22 é demonstrado o perfil dos metabólitos que foram extraídos usando o procedimento de microextração e analisadas por MALDI-TOF MS. Os

espectros adquiridos mostram duas séries homólogas de íons detectados em m/z 1000-1100 e m/z 1450-1560 para os microextratos obtidos do controle de *B. subtilis*, e das três amostras extraídas, sendo essas: um da área próxima à bactéria, uma área próxima ao fungo, e um da posição intermediária entre os dois microrganismos. Os íons da série homóloga de m/z 1000-1100 foram atribuídos à surfactinas e iturinas, e os íons detectados a m/z 1450-1560 correspondem às fengicinas.

Essas duas séries de metabólitos são lipociclopeptídeos surfactantes já descritos na literatura como metabólitos produzidos por espécies de *Bacillus*, e apresentam potente atividade antimicrobiana.

A presença destes compostos em todos os microextratos coletados em diferentes regiões da placa de co-cultura corrobora a hipótese da difusão desses metabólitos pelo meio de cultura, explicando o crescimento assimétrico das colônias de fungos.

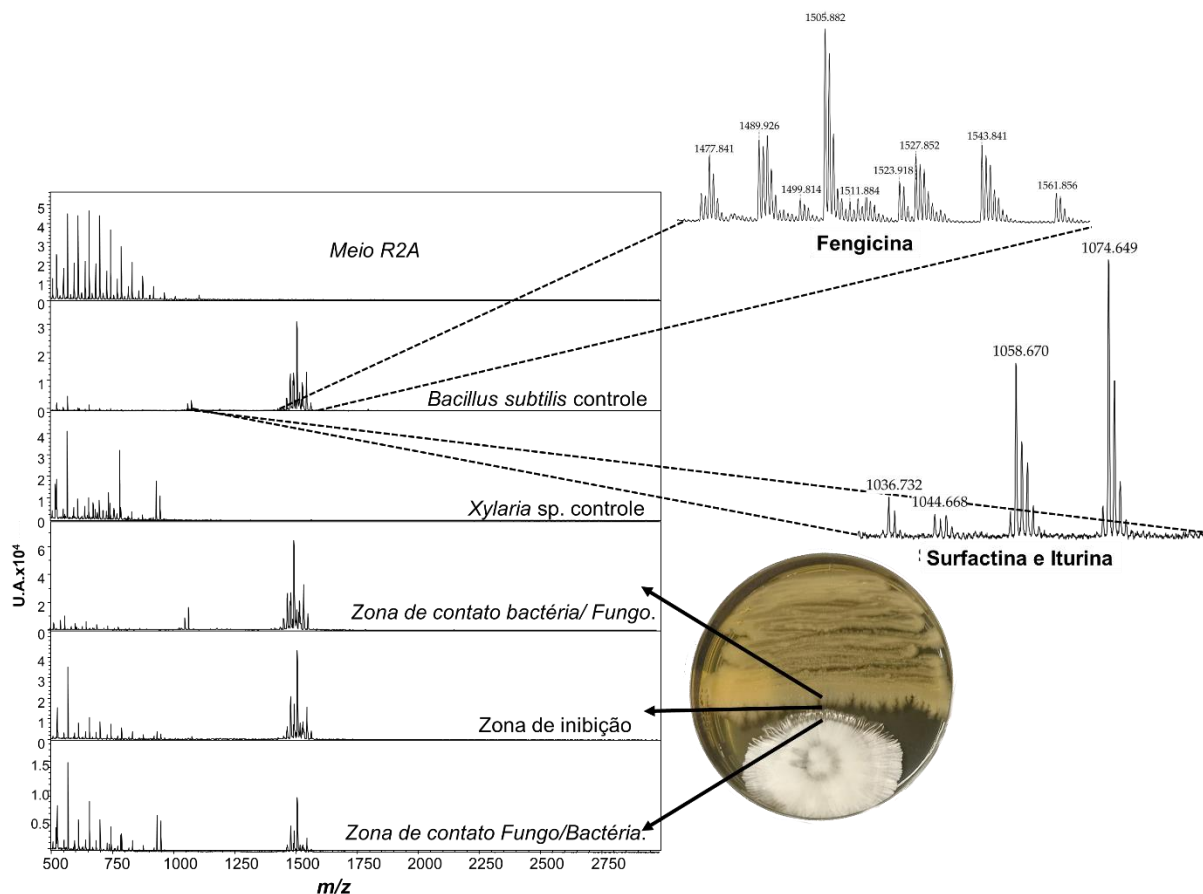


Figura 2.22 Perfil dos espectros de MALDI TOF/MS para os microextratos do experimento de interação entre o isolado LaBioMMi 1180 e *Xylaria sp.* isolada do *Podocarpus macrophyllus*.

Na literatura existem vários trabalhos citando a atividade antimicrobiana dos metabólitos de *Bacillus* spp. Essas bactérias possuem boas características para serem consideradas candidatas como agentes de controle biológico, protegendo as plantas contra o ataque de patógenos. Um total de 64 cepas de *Bacillus* spp., isoladas de diferentes hospedeiros, foram avaliadas como agentes para o controle de diversos fitopatógenos por Mora et. al.¹⁵². A maioria dessas cepas apresentou genes relacionados à produção de diversos lipociclopeptídeos incluindo iturina, bacilomicina, fengicina e surfactina.

A produção destes ciclopeptídeos e sua atividade antibacterina foram demonstradas por meio de ensaios contra os fitopatógenos *C. michiganensis*, *E. amylovora*, *P. carotovorum*, *P. syringae*, *R. radiobacter* and, *R. solanacearum*, *X. arboricola* e *X. axonopodis*¹⁵³.

O efeito antifúngico de *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* foi avaliado contra *Macrophomina phaseolina* por Torres et. al.¹⁵³ e observou-se que as surfactinas e as iturinas foram os metabólitos majoritários no meio líquido juntamente com a fengicina.

As alterações estruturais causadas em *M. phaseolina* por estes metabólitos foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura e MALDI-TOF MS. Evidenciou-se que os metabólitos surfactina, iturina e fengicina induziram danos nos escleródios de *M. phaseolina*, resultando em importante efeito antifúngico e inibição do crescimento¹⁵⁴.

Os *clusters* biossintéticos responsáveis pela produção de iturina C, surfactina, bacilomicina D e as fengicinas A e B foram confirmados por RT-PCR e, posteriormente, esses peptídeos foram detectados por MALDI-TOF MS por Sajitha et. al.¹⁵⁴ A aplicação desses metabólitos foi avaliada contra *Lasiodyplodia theobromae*, um fungo causador de fitopatologias em uma seringueira, mostrando resultados promissores¹⁵⁵.

5 Conclusões

As ferramentas de análise dos *fingerprints* de microrganismos adquiridos por MALD-TOF MS, podem ser aplicadas na identificação e diferenciação de microrganismos, também podem ser aplicadas na triagem e seleção de microrganismos a serem utilizados em experimentos, assim como a determinação de metabólitos alvos a serem estudados.

A utilização dos espectros adquiridos nas regiões de 700 a 3000 Da e 2000 a 20000 Da aliados a ferramentas de análise multivariada foram imprescindíveis para a seleção dos isolados de trabalho LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202, quando comparados à biblioteca de *Bacillus* spp. isolados a partir de *Podocarpus macrophyllus*. Adicionalmente, a utilização de ferramentas de reconhecimento de padrões, *scores* aliados ao gráfico de *loadings*, pode-se verificar quais eram os marcadores químicos que diferenciavam essas cepas e quais compostos eram comuns a todas elas.

Os experimentos em larga escala possibilitaram o isolamento de moléculas de Iturina e Surfactina, que são comuns a todos os isolados, bem como dos marcadores Plantazolicina e Fengicina, que são exclusivas dos isolados LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) e LaBioMMi 1180 e 1202 (*Bacillus subtilis*), respectivamente.

Embora não tem sido possível observar correlação entre o perfil de compostos voláteis dessas bactérias com o do óleo essencial das folhas do *Podocarpus macrophyllus*, diversos compostos com aplicabilidade biotecnológica puderam ser identificados. Essas bactérias são hábeis produtoras de pirazinas, que podem ser de grande interesse para a indústria de flavorizantes.

Outros metabólitos com possível interesse na aplicação com biocontrole são diversos compostos oxigenados, como as cetonas de cadeia curta e o benzaldeído, que apresentam atividade contra patógenos de plantas. Juntamente com esses compostos, o DTMS também apresenta atividade antimicrobiana e em alguns casos pode atuar como indutor do crescimento de raízes de mudas.

Esses resultados são reforçados pelos resultados dos experimentos de interação de bactérias e fungos. Em todos os casos avaliados as bactérias demonstraram efeitos inibitórios sobre o crescimento dos fungos. Enquanto para o fungo *Cladosporium* sp. parece haver um sinergismo entre a atuação dos metabólitos

fixos e voláteis, para *Xylaria* sp. e *Trichoderma* sp. o efeito inibitório parece ser devido à difusão de compostos bioativos através do meio de cultura.

CAPÍTULO 3:

Potencial de aplicação biotecnológica: Experimento de bioissorção de metais pesados e de biodegradação de polímeros por *Bacillus* sp. isolado de *Podocarpus macrophyllus*.

1 Introdução

A agenda ambiental deveria ser uma das principais dentre todas as áreas de atuação do Estado, haja vista que problemas ambientais não afetam apenas a fauna e flora, mas futuramente a sustentação da vida como um todo. A degradação ambiental afeta um delicado equilíbrio ecológico entre os organismos que convivem em determinada região. Adicionalmente, outros diversos problemas podem ser gerados por meio da degradação dessas áreas ocasionadas pela interferência do ser humano, como por exemplo: mudanças climáticas com alteração no regime de chuvas, processos de desertificação, redução de diversidade biológica, perda de patrimônio genético, etc.

Sem sombra de dúvidas, considerando-se a área de produtos naturais, a perda de patrimônio genético e o desaparecimento de espécies é uma grande perda para ciência, pois diversos processos ecológicos deixam de existir e serem estudados. A fonte de descoberta de milhares de novas substância naturais deixa de existir, substâncias essas que poderiam revolucionar alguns aspectos da vida humana.

1.1 Crimes ambientais e poluição ambiental através da contaminação por despejo de rejeitos de mineração

Em 2015, a cidade de Bento Rodrigues, no município de Mariana em Minas Gerais, foi varrida do mapa após o rompimento da barragem do Fundão, da mineradora Samarco, controlada pelas empresas Vale e BHP Billiton. Cerca de 62 milhões de metros cúbicos de rejeitos de mineração foram liberados com o rompimento da barragem, cuja composição principalmente era de óxido de ferro, água e lama.

Além disso, o rastro de destruição que avançou pelo Rio Doce gerou impactos ambientais incalculáveis e, provavelmente, irreversíveis. Dentre os diversos impactos pode-se citar que a cobertura de lama impedirá o desenvolvimento de espécies vegetais, devido ao baixo teor de matéria orgânica, as alterações do pH e a completa desestruturação química do solo, o que tornará toda afeta região infértil.

Além do solo, o rompimento da barragem afetou o rio Gualaxo, afluente do rio Carmo, que por sua vez deságua no Rio Doce. À medida que a lama atinge os ambientes aquáticos, vários peixes morreram em razão da falta de oxigênio dissolvido na água e em consequência da obstrução das brânquias. O ecossistema aquático desses rios foi completamente afetado, muitos desses rios sofrerão com assoreamento, mudanças nos cursos, diminuição da profundidade e até mesmo soterramento de nascentes¹⁵⁶.

De fato, o Brasil parece sofrer uma síndrome de Estocolmo com mineradoras. No estado de Minas Gerais já ocorreram diversos desastres ambientais com rompimentos de barragens. Em 1986, a barragem de Fernandinho, em Itabirito, rompeu-se matando 7 pessoas, sendo esse o registro mais antigo.

Em 2001, o rompimento da barragem da mineração Rio Verdes em Macacos, distrito de Nova Lima, assoreou 6,4 Km do córrego Taquaras, atingiu 43 hectares e matou 5 operários. Em 2003, em Cataguases, na Zona da Mata, o reservatório de resíduos oriundos de indústria de papel rompeu liberando 1,4 bilhão de litros de lixívia no córrego Cágado, afetando 3 estados e deixando cerca de 600 mil pessoas sem água potável.

Em 2007, uma barragem rompeu em Miraí, na zona da Mata, deixando cerca de 4000 moradores desalojados e 1200 casas atingidas nos bairros de Miraí e Muriaré. Em 2014, a barragem da Herculano mineração rompeu-se e soterrou os operários que realizavam manutenção na mesma¹⁵⁷.

Mais recentemente, em 25 de janeiro de 2019, o rompimento da barragem de Brumadinho, considerado o maior desastre ambiental causado por rompimento de barragem, segundo a Organização Internacional do Trabalho (OTI). Após o desastre de Brumadinho, a Agência Nacional de Águas (ANA), disponibilizou um relatório contendo as condições de 3386 barragens, sendo que 1118 dessas apresentam alto risco de rompimento, e as demais risco médio ou baixo¹⁵⁸. A Tabela 3.1 lista a quantidade de barragens com alto risco de rompimento no território brasileiro¹⁵⁹.

Tabela 3.1. Quantidade de barragens com alto risco de rompimento por estados do Brasil.

Estado	Quantidade de Barragens
Paraíba	405
Rio Grande do Norte	221
Bahia	205
Pernambuco	100
Piauí	30
Mato Grosso do Sul	29
Paraná	22
Alagoas	21
Acre	21
Rondônia	15
Sergipe	11
Ceará	10
Pará	6
Goiás	5
Minas Gerais	5
Espírito Santo	4
Tocantins	3
Rio de Janeiro	2
São Paulo	2
Mato Grosso	1
Maranhão	1
Roraima	1
Amapá	1
Santa Catarina	1

A área afetada pelos desastres da Brumadinho e Mariana pode ser visualizada na Figura 3.1 que demonstra o mapa com as áreas que sofreram os efeitos dos resíduos liberados. Desde o ocorrido em Mariana, o Instituto Chico Mendes de Conservação de Biodiversidade (ICMBio) vem realizando o monitoramento das condições dos ambientes afetados pelos resíduos despejados.

Em 2016 o instituto divulgou um relatório técnico a partir das análises realizadas com amostras de água e de peixes coletadas na Foz do Rio Doce, observou-se que ocorreram aumentos significativos nos níveis de contaminação da água do mar por Cd, Cr, Cu, Fe, Mn e Pb após a ocorrência do evento.

Em análises sequenciais observaram-se reduções significativas nas concentrações de Cd, Cr, Cu e Pb, não que os mesmos tenham sido removidos do

ambiente, mas podem ter precipitado no leito do rio e em certas condições podem ser ressuspendidos. Entretanto, nas mesmas análises sequenciais, as concentrações dos metais associados à mineração ainda apresentavam concentrações elevadas, como por exemplo Fe e Mn.

Os dados das concentrações de metais acumulados no músculo e no fígado de um grande número de espécies de peixes coletados na Foz do Rio Doce, demonstrou a bioacumulação desses na fauna desses ambientes, confirmando desse modo a importante contribuição desse evento para a contaminação das águas costeiras com metais não diretamente associados à atividade de mineração, tais como o Cd, Cu e Pb, bem como com aqueles diretamente associados a esta atividade, tais como Fe e Mn^{160,161}.

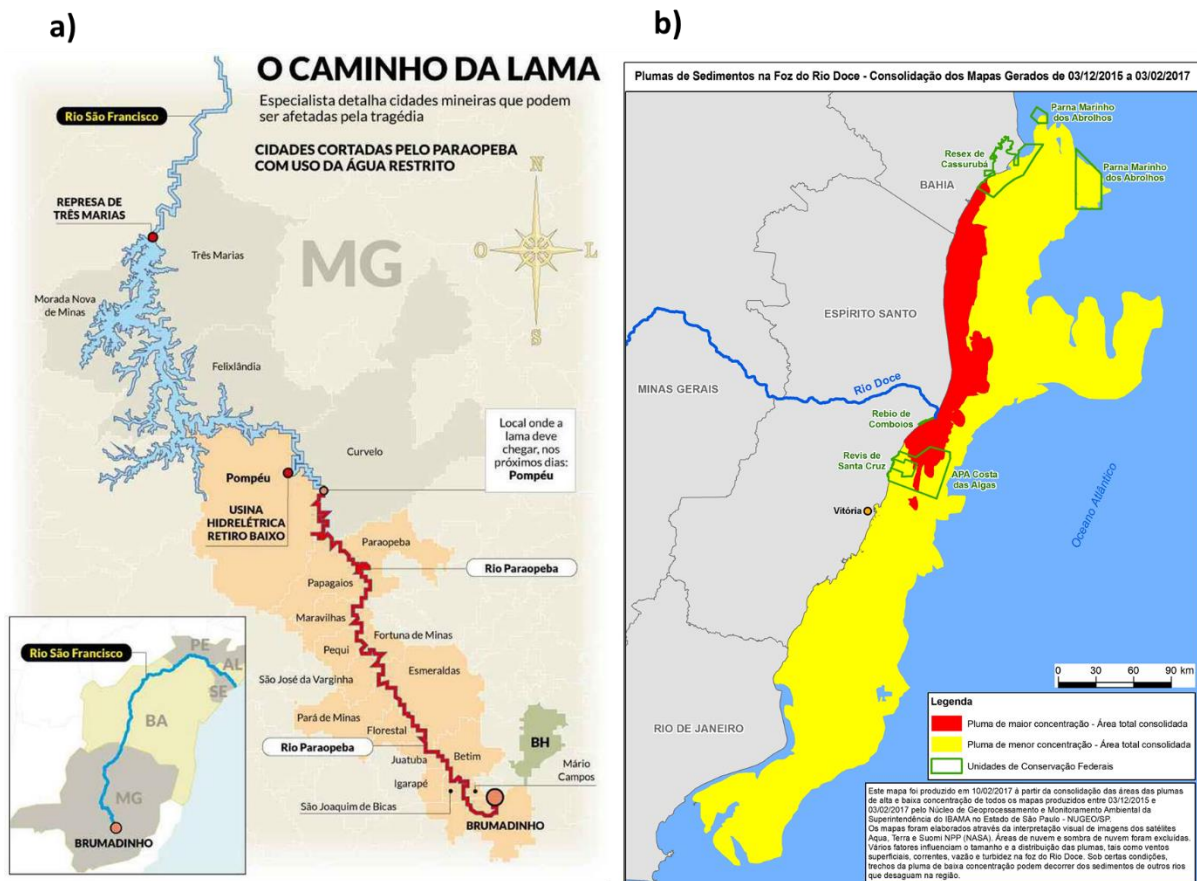


Figura 3.1 Regiões afetadas pelos rompimentos das barragens em a) Brumadinho e b) Mariana^{151,152}.

1.2 Poluição ambiental por despejo de materiais poliméricos

O consumo mundial de plástico ainda tende a aumentar, tal tendência é reforçada pela expansão de plantas petroquímicas que estão prestes a entrar em

operação. A previsão para o final de 2018, somente para o mercado asiático, era a produção de 2,5 milhões de toneladas de resinas plásticas. A Figura 3.2 ilustra o volume da produção de resinas plásticas pelo mundo¹⁶².

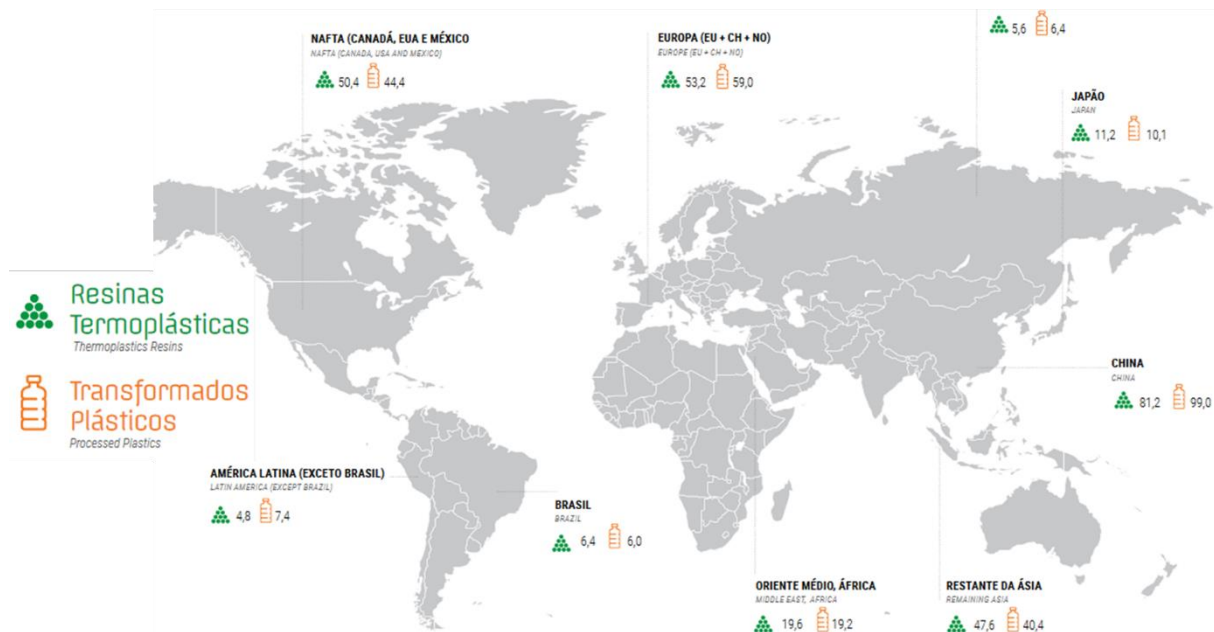


Figura 3.2. Produção mundial de resinas termoplásticas e de transformados plásticos (2016). Fonte: Perfil 2017 ABIPLAST¹⁵³.

Essa enorme dependência por materiais plásticos gera um grande custo para o meio ambiente. De acordo com o Programa Ambiental das Nações Unidas (PNUMA) estima-se que somente nos oceanos, cerca de 90% de todos os detritos são compostos por plástico, e dessa quantidade de resíduos estima-se que existam 18400 fragmentos de plástico por quilômetros quadrados da superfície dos oceanos. Estima-se também que para cada quilo de algas marinhas e plâncton encontrado nos oceanos, há pelo menos seis quilos de plástico. A vida animal também é drasticamente afetada, sendo crescente os relatos de animais mortos ou lesionados devido à ingestão de polímeros ou por ficarem presos¹⁶³.

A tendência do panorama não é animadora. Um estudo do governo do Reino Unido estima que até 2025, os oceanos estarão três vezes mais poluídos com plástico. De tal forma que a situação fique ainda pior do que já ocorre atualmente, haja vista que de acordo com as estimativas existam ao menos 5,25 trilhões de pedaços de plástico com tamanho médio de cinco milímetros nos oceanos. Em 2016, um estudo divulgado no Fórum Econômico Mundial de Davos estimou que até 2050 os oceanos terão mais pedaços de plástico do que peixes¹⁶⁴.

A maneira como a humanidade emprega o uso do plástico é potencialmente danosa e implica no aumento do problema causado por esse tipo de resíduo, caso não haja mudanças no perfil de consumo desses materiais, haja vista que aproximadamente 50% do conteúdo de plásticos produzido é destinado para aplicações descartáveis, como embalagens, filmes agrícolas e itens de consumo. Para produtos de consumo duráveis como tubos, revestimentos de cabos e materiais estruturais, a porcentagem da produção é de cerca de 20 a 25%, e o restante da produção é destinada para produção de bens com durabilidade intermediária, como produtos eletrônicos, móveis, veículos, etc¹⁶⁵.

Mesmo quando um item de plástico se degrada sob a influência do intemperismo, ele primeiro se decompõe em fragmentos menores, mas o próprio polímero pode não se degradar completamente em um período significativo. A duração do impacto que o descarte de plásticos no meio ambiente não é totalmente conhecido, pois a produção em massa desses produtos iniciou-se a cerca de 60 anos.

As taxas de degradação podem variar consideravelmente entre os tipos de ambiente nos quais se encontram como: aterros, ambientes terrestres e marinhos. Os mecanismos que envolvem o processo de degradação são variados e complexos. Adicionalmente o material pode ser apenas fragmentado, de tal forma que o próprio polímero não degrade completamente em um período significativo. Assim, a maior parte desses materiais não são biodegradáveis, e, portanto, apresentam enorme durabilidade, perdurando por décadas no meio ambiente¹⁶⁶.

Mesmo a durabilidade de materiais projetados para serem degradáveis não é totalmente conhecida, pois os processos que envolvem a degradação dos mesmos são dependentes de diversos fatores como os níveis de exposição à luz ultravioleta, oxigênio, temperatura, e a presença de uma microbiota colonizando o ambiente¹⁶⁷. Como consequência, quantidades substanciais de microplásticos estão se acumulando em aterros e no ambiente natural, resultando em problemas de gerenciamento de resíduos, danos ambientais, e danos a saúde dos seres humanos¹⁶⁷⁻¹⁷⁰.

1.3 Microrganismos e a promessa para mitigação de ambientes poluídos

Biorremediação é definido como o processo no qual organismos vivos como plantas ou microrganismos são utilizados na reestruturação ou mitigação de problemas ambientais através da remoção ou redução das concentrações de substâncias poluentes nos ambientes afetados. As metodologias de biorremediação são classificadas com relação ao local no qual o tratamento do material contaminado é realizado. “*In situ*”, no local da contaminação, “*Ex situ*”, na qual o material contaminado é retirado do local de origem e tratado em outro lugar. As metodologias de biorremediação vêm sendo largamente estudadas e aprimoradas, pois apresentam grandes vantagens como o fato de não causarem poluição secundária ou causar impactos inferiores a outros métodos.

No entanto, a desvantagem é o tempo necessário para a descontaminação através de processos de biorremediação, pois a eficiência dos organismos é condicionada a diversos fatores como: presença de microrganismos suficientes para biorremediação dos contaminantes, disponibilidade dos nutrientes necessários para o crescimento dos microrganismos, tempo suficiente para permitir que o processo natural de degradação do contaminante ocorra¹⁷¹. Sendo as principais técnicas:

Bioaugmentation: Neste método, cepas competentes específicas são introduzidas ao ambiente contaminado para melhorar a capacidade de degradação. Há dificuldade no monitoramento deste sistema. Quando a limpeza imediata do local é necessária, essa não é a melhor abordagem, pois o processo *in situ* é lento¹⁷¹.

Biostack: Neste método, há a escavação e mistura dos solos contaminados, seguido da adição de sistema de aeração forçada, sistema de irrigação/nutrientes e um sistema de coleta de chorume. Os parâmetros umidade, calor, nutrientes, oxigênio e pH podem ser avaliados na otimização do processo de biorremediação¹⁷¹.

Biosparging e *Bioventing*: são métodos de tratamento “*in situ*” que envolvem a injeção de ar e nutrientes através de poços para o ambiente contaminado, estimulando a microbiota nativa do local, sendo o *Biosparging* aplicação de ar pressurizado e *Bioventing* ar a baixo fluxo. Para acelerar o processo real de biorremediação, esses materiais contaminados devem ser mantidos em um ambiente

contido, o que facilita o monitoramento e a manutenção das condições, contudo aumenta os custos do processo¹⁷¹.

Landfarming: Neste método o solo contaminado é espalhado sobre um leito preparado e arado periodicamente até a degradação da maior porcentagem dos contaminantes. Este método é de grande interesse devido ao seu potencial de redução de custos com monitoramento e manutenção, bem como os passivos de limpeza¹⁷¹.

Composting: Neste método o material contaminado é misturado com resíduos orgânicos não perigosos como esterco e/ou resíduos agrícolas. Como resultado, a população microbiana possui um fonte rica de nutrientes e se desenvolve, elevando a temperatura durante o processo de degradação e transformando os resíduos orgânicos degradáveis em substâncias semelhantes ao húmus¹⁷¹.

Bioreactor: Neste método é necessário a utilização de um sistema de contenção projetado para o processamento do material contaminado. A fim de se aumentar a eficiência do processo de degradação dos contaminantes, a combinação de biorreatores com alguns dos métodos de biorremediação mencionados acima compõem estratégias eficazes.

Biotraps são quaisquer organismos (vivos ou não-vivos), ou metabólitos desses organismos que podem se ligar ou alterar o estado de um metal tóxico permitindo dessa forma a sua remoção e a recuperação da água ou do solo poluído¹⁷². Existem vários mecanismos de biorremediação tais como: bioissorção, interações metal-micróbio, bioacumulação, biomineralização, biotransformação e biolixiviação.

A resposta dos microorganismos aos metais pesados tóxicos é muito importante para a recuperação de locais poluídos¹⁷³. Bactérias podem desenvolver diversos mecanismos de resistência a esses ambientes tóxicos para garantir a sua sobrevivência.

Algumas das alternativas são incluem: (1) exclusão: os íons metálicos são mantidos longe dos locais-alvo; (2) extrusão: os metais são expelidos da célula através de moléculas mediadoras; (3) acomodação: os metais são complexados por metabólitos ou outros componentes celulares; (4) biotransformação: o metal tóxico é convertido em estados menos tóxicos para o microrganismo^{174,175}.

2 Objetivos

Avaliar o potencial do *Bacillus* sp. na bioissorção de metais pesados e sua aplicabilidade em biorremediação.

Avaliar o potencial do *Bacillus* sp. na biodegradação de compostos poliméricos.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar a bioissorção dos metais Fe^{3+} e Cu^{2+} pelo um *Bacillus* sp. associado à *Podocarpus macrophyllus*.

Determinar as curvas de crescimento dessas bactérias na presença desses metais.

Avaliar a influência de diferentes efeitos no crescimento da bactéria por meio da utilização de planejamento fatorial.

Verificar a produção de moléculas sidefóras e a relação destas com a bioissorção de metais.

Avaliar por gravimetria o consumo de materiais poliméricos, quando utilizados como única fonte de carbono.

Avaliar os extratos obtidos a partir do caldo de cultura em busca de oligômeros que confirmem o processo de biodegradação.

Avaliar as alterações nas propriedades físico-químicas dos polímeros que indiquem a ação das bactérias durante o processo de biodegradação.

3 Métodos

3.1 Materiais e reagentes utilizados para o cultivo e dos microrganismos nos experimentos de Bioissorção e Biodegradação

Mueller Hinton – marca: HIMEDIA®

Agar Nutriente – marca: HIMEDIA®

PEAD –marca: Sigma Aldrich®

PP – marca: Sigma Aldrich®

PS – marca: Sigma Aldrich®

PA-11 – marca: Sigma Aldrich®

PET – Sigma Aldrich®

Erlenmeyer 125 mL

Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico - marca: Sigma Aldrich®

Glicerol - marca: Synth®

Ácido glutâmico - marca: Sigam Aldrich®

Ácido cítrico - marca: Synth®

K_2HPO_4 - marca: Synth®

Citrato de ferro amoniacal - marca: Synth®

$MgSO_4$ - marca: Synth®

KH_2PO_4 - marca: Synth®

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - marca: Synth®

NH_4NO_3 - marca: Synth®

NaCl - marca: Synth®

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - marca: Synth®

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - marca: Synth®

$CaCO_3$ - marca: Synth®

Papel de filtro qualitativo (80 g/m², 11 cm) UNIFIL® e n° 1 WHATMAN®

Funil de analítico

Funil de separação

Tubo falcon de 15 mL

Eppendorf 2 mL

Bastão de Vidro

Palito de dente

Água Milli-Q

3.2 Equipamentos utilizados para o cultivo nos experimentos de Biossorção e Biodegradação

Autoclaves PHOENIX® AV 30 e AV 75

Balanças Tecnal® Mark 210 A Classe I, Mark 2200 classe II, Shimadzu® AUY220 e Shimadzu® AUW220D

BOD Tecnal® TE-371 e TE391

Câmara de fluxo laminar vertical PACHANE ®modelo 50

Estufa Bacteriologica

Moinho de corte Restch® SM300

Ultrassom UNIQUE® USC-1800 e UNIQUE Ultracleaner-1400

3.3 Equipamentos utilizados nos experimentos de Biossorção e Biodegradação

Espectrômetro de massas BRUKER® Autoflex Speed MALDI-TOF/TOF no modo positivo, equipado com Smartbean-II laser technology com taxa de repetição ajustável até 1 kHz (355 nm), operando em modo linear e controlado pelo software FlexControl® versão 3.3 da Bruker Daltonics® com aquisição automática de dados

Sistema de água ultrapura ELGA® Purelab Classic modelo CLXXXUVM

Target para MALDI-TOF BRUKER® MTP-384 ground steel TP S/N 05480 part number 209519

Analizador dinâmico mecânico Perkin Elmer® DMA 8000

Calorímetro diferencial de varredura (DSC) TA instruments® Q200

Espectrometro de infravermelho com transformada e Fourier acoplado a acessório de reflectância atenuada BB BOMEN® FTLA2000-102

ICP OES Thermo Scientific® iCAP 6000

Estufa bacteriológica

Estufa FANEM® 315 SE

Estufa a vácuo Ethik® 440-D

Bomba de vácuo New Pump®

pHmetro Tecnal® Tec-3MP

Ultrassom UNIQUE® USC-1800A

Pipeta automática 10 µL Eppendorf®

Pipeta automática 1000 µL Eppendorf®

Ponteira descartável 100 µL

Ponteira descartável 1000 µL

3.4 Softwares utilizados no processamento dos dados dos experimentos de Biossorção e Biodegradação

flexAnalysis 3.3® (Build 65) Bruker Daltonics GmbH

MALDI Biotyper® OC 3.1 Bruker Daltonics GmbH

Excel pacote office® 365

OriginPro® 2017 (64-bit) b.9.4.0.220 versão de pacote para estudante

Minitab® 18 versão de pacote para estudante

3.5 Experimento de biossorção de metais pesados:

3.5.1 Preparação dos meios de cultura

Os experimentos de biossorção de Fe^{3+} e Cu^{2+} foram realizados utilizando-se o meio específico para *Bacillus* spp. como base, cuja composição é: 20,0 g de glicerol, 4,0 g de ácido glutâmico, 2,0 de ácido cítrico, 0,5 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de citrato de ferro amoniacal, 0,5 g de MgSO_4 , com o pH ajustado para aproximadamente 7,4. Os experimentos foram feitos em erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura que foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

3.5.2 Estimativa da curva de crescimento do isolado LaBioMMi 1141 (*Bacillus* sp.) em meios de cultura enriquecidos com Fe³⁺ e Cu²⁺

As curvas de crescimento foram estimadas utilizando um espectrofotômetro para a aquisição dos dados experimentais de densidade óptica. O isolado LaBioMMi 1141 foi cultivado no meio *Bacillus* em três condições distintas: (1) 262 mg/mL de Fe³⁺, (2) 0,06 mg/mL de Cu²⁺ e (3) 175 mg/mL Fe³⁺ e 0,04 mg/mL de Cu²⁺.

Os microrganismos foram cultivados em triplicada, a 35 °C e sob agitação de 120 rpm. Periodicamente, utilizando pipetas estéreis, 1,0 mL era retirado do meio cultura, adicionado em uma cubeta e a leitura da densidade óptica feita a 620 nm. O procedimento foi repetido até a estabilização dos valores de OD e os gráficos das curvas de crescimento foram gerados no software OriginPro® 2017.

3.5.3 Elaboração do planejamento fatorial fracionado

Para avaliar a bio sorção de Fe³⁺ e Cu²⁺ pelo isolado LaBioMMi 1141, foram realizadas alterações nas condições de cultivo, de modo que as possíveis alterações sofridas na capacidade de bio sorção dos metais fossem monitoradas, assim como também estabelecer como e quais condições de cultivo influenciam o processo.

Utilizou-se o planejamento experimental para se efetuar a avaliação desse problema. Com auxílio da curva de crescimento, juntamente com as descrições do manual de preparo do meio de cultura para *Bacillus* spp., foram escolhidos 5 fatores que poderiam influenciar sobre a resposta de interesse, no caso a quantidade de metais removida do meio de cultura. Com auxílio do software Minitab® 18 foi elaborado um planejamento fatorial fracionado 2⁽⁵⁻²⁾ para o estudo separado do Fe³⁺ e Cu²⁺. E um fatorial 2⁽⁶⁻³⁾, para o estudo conjunto do Fe³⁺ e Cu²⁺. O o procedimento foi desenhado para ser realizado em triplicada e o resultado foi um total de 24 experimentos para cada um dos casos avaliados com Fe³⁺, Cu²⁺ e bio sorção conjunta, respectivamente.

3.5.4 Determinação da concentração de metais no meio de cultura

Previamente à determinação da concentração de Fe^{3+} e Cu^{2+} nas amostras, o meio de cultura contendo as células de LaBioMMi 1141 foi centrifugado a 7000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e seu volume foi aferido para 100 mL. Posteriormente, uma alíquota de 10 mL foi transferida para um tubo falcon de 15 mL e acidificada com solução de HNO_3 a 10 % até pH 2, para conservação da amostra. As determinações das concentrações residuais de Fe^{3+} e Cu^{2+} foram realizadas em um ICP-OES da marca Thermo Scientific modelo iCAP 6000, em parceria com o Professor Dr. Edenir Rodrigues Pereira.

3.6 Metodologia de aquisição dos espectros de MALDI-TOF MS

Previamente a aquisição dos espectros, a biomassa de células intactas do isolado LaBioMMi 1141 foi separada do meio de cultura utilizando uma centrifuga com velocidade de rotação de 7000 rpm por 15 minutos. Os espectros das células intactas foram adquiridos em um espectrômetro de massas Bruker® *Autoflex speed* (Bruker Daltonics, GmbH) equipado com o laser *Smartbean II* (355 nm) e operado pelo software *flexControl®* (versão 3.3, Bruker Daltonics, GmbH).

O equipamento foi previamente calibrado com o padrão de PEG1500. A intensidade do laser foi ajustada de acordo com o padrão de calibração e os espectros foram adquiridos no modo reflectron, MALDI (+)-TOF/TOF MS, de aquisição de íon na faixa dinâmica de 700 a 3000 Da. Os espectros foram adquiridos manualmente em diferentes posições do *spot*. Os parâmetros do espectrômetro em cada modo estão listados na tabela abaixo:

Tabela 3.2. Descrição dos parâmetros de operação utilizados na aquisição dos íons nos modos linear e reflectron.

Parâmetro	Modo Reflectron
<i>Number of shots</i>	2000
<i>Laser repetition rate</i>	1000
<i>Ion source voltage 1</i>	20 kV
<i>Ion source voltage 2</i>	17,4 kV
<i>Lens voltage</i>	8,5 kV
<i>Reflector voltage 1</i>	22 kV

<i>Reflector voltage 2</i>	10 kV
----------------------------	-------

3.7 Processamento dos dados de MALDI - TOF/TOF MS

Os dados adquiridos foram processados utilizando os softwares flexAnalysis® versão 3.3 e MALDI Biotyper® 3.1 (Bruker Daltonics GmbH). Previamente as análises realizadas: comparação com o banco de dados de espectros do Biotyper®, as análises de componentes principais (PCA), os espectros foram pré-processados de acordo com parâmetros padrões recomendados para cada uma dessas análises. A seguir os parâmetros de pré-processamento estão listados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Parâmetros utilizados no pré-processamento para identificação das bactérias, análise de componentes principais e matriz de índice de correlação.

	<i>Parameter</i>	<i>PCA</i>
<i>Mass</i>	<i>Range [Da]</i>	700-2500
	<i>Method</i>	Selected range
<i>Smoothing</i>	<i>Method</i>	Savitsky-Golay
	<i>Frame size [Da]</i>	25
	<i>Nº of runs</i>	2
<i>Normalization</i>	<i>Método</i>	Minimum
<i>Peak Picking</i>	<i>Max. Peak</i>	100
	<i>Thresold</i>	0,01
	<i>Method</i>	Peak fitting
	<i>Profile</i>	Gauss

Tabela 3.4. Parâmetros utilizado nas análises de componentes principais (PCA) e matriz de índice de correlação (CCI).

	<i>Parameter</i>	<i>Value</i>
<i>PCA and CCI creation</i>	<i>Lower bound</i>	3000
	<i>Upper Bound</i>	15000
	<i>Resolution</i>	02-04
<i>PCA Clustering</i>	<i>Method</i>	Hierarchical
	<i>Distance Measure</i>	Correlation
	<i>Linkage Algorithm</i>	Average
	<i>Maximal Cluster</i>	4

3.8 Experimento de biodegradação de materiais poliméricos

Os experimentos de degradação polimérica foram realizados em parceria com o Núcleo de Competências em Química do Petróleo (NCQP - UFES), utilizando a estrutura dos Laboratórios de Polímeros e do Laboratório de Instrumentação, em parceria com os professores Dr. Geovane Lopes de Sena e professor Dr. Eustáquio Ribeiro de Castro.

3.8.1 Preparação das amostras poliméricas para o ensaio de biodegradação

Os *pellets* das amostras de polietileno de alta densidade (PEAD), polipropileno (PP), poliestireno (PS), poliamida 11 (PA-11) e polietileno tereftalato (PET) foram pulverizados em um moinho de corte da marca Restch®, modelo SM 300, com as 1400 rpm para se obter granulometria de 0.5 mm ut. Os experimentos de biodegradação foram conduzidos utilizando-se o meio descrito na norma ASTM G22-76¹⁷⁵ que determina os critérios para avaliação da resistência de plásticos às bactérias. O meio líquido de cultura basal, sem carbono, (LCFBM) é composto por 0,7 g de KH_2PO_4 , 0,7 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 de NH_4NO_3 , 0,005g de NaCl, 0,002 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,001g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Os experimentos foram feitos em erlenmeyer de 250 mL contendo 80 mL de meio basal, no qual foi adicionado 1,0 g do polímero. E em seguida os materiais do experimento foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

O inóculo do isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*) foi preparado a partir do cultivo de uma colônia por 24 horas a 37 °C. Em 5 mL de caldo nutriente. Em seguida 100 µL foram inoculados em cada Erlenmeyer e incubados a 37 °C, sob agitação a 120 rpm, pelos períodos de 30 e 60 dias.

3.8.2 Determinação gravimétrica da perda de massa e obtenção do extrato do caldo de cultura do meio LCFBM

A estimativa da perda de massa foi realizada de acordo com os procedimentos adaptados a partir de Awasthi et al.¹⁷⁶, no qual o material sólido contido no meio de cultura foi separado por filtração e lavado com água destilada em abundância. O material polimérico lavado foi colocado em papel de filtro e seco a 60 °C até massa constante. Os experimentos foram realizados em triplicada e as massas

das amostras foram medidas em uma balança analítica da marca Shimadzu, UW220. A perda de massa foi calculada segundo a Equação 3.1:

$$\text{Porcentagem de perda de massa} = \frac{(\text{Massa inicial} - \text{Massa final})}{\text{Massa inicial}} \times 100 \text{ Equação 3.1}$$

O caldo de cultura obtido a partir do processo de filtração foi extraído com 3 x 80 mL de acetato de etila, seco com sulfato de sódio anidro (NaSO₄) e concentrado em rotaevaporador.

3.8.3 Obtenção do espectro de FTIR para as amostras poliméricas

A caracterização das amostras por infravermelho foi realizada com procedimento adaptado da norma ASTM D5477-18¹⁷⁷. Foi utilizado um infravermelho da marca BB BOMEN, modelo FTLA2000-102, acoplado ao acessório de refletância total atenuada (ATR) operado através do *software* GRAMS/AI (Thermo Galatctic®).

As amostras do polímero foram inseridas sobre uma placa de cristal de reflexão e um total de 32 varreduras foram realizadas na região de 4000 a 630 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹. O espectro de fundo foi realizado tem ar como controle e foi adquirido antes da análise de cada amostra.

3.8.4 Determinação da temperatura de transição vítrea para as amostras poliméricas

A caracterização das temperaturas de transição vítrea foi feitas em um analisador dinâmico mecânico (DMA) da marca PerkinElmer®, modelo DMA 8000. As análises foram realizadas seguindo procedimentos adaptados da norma ASTM D7028-07¹⁷⁸, utilizando o acessório "*material pocket*" para análises de materiais pulverizados.

Cerca de 100 mg das amostras foram adicionadas no "*material pocket*" e em seguida a medida das dimensões do mesmo foram efetuadas. Os materiais foram avaliados utilizado deslocamento máximo de 0,050 mm nas frequências de 1 e 10 Hz. A faixa de temperatura aplicada foi de 50 °C acima e abaixo da temperatura de transição vítrea descritas na literatura para cada material.

3.8.5 Determinação das temperaturas de fusão e cristalização, entalpias de fusão e cristalização para as amostras poliméricas

A determinações das temperaturas de fusão e cristalização feitas, juntamente com as entalpias envolvidas em tais transições, foram efetuadas em um calorímetro diferencial de varredura (DSC) da marca TA instruments® modelo Q200. Os ensaios foram realizados seguindo a metodologia adaptada a partir da norma ASTM D3418-15¹⁷⁹ e o cálculo do grau de cristalinidade foi realizado com base na norma ASTM F2625-10¹⁸⁰ e na “*thermal application notes*” fornecida pela TA instruments¹⁸¹.

O procedimento de análise consistiu na pesagem de 5 mg, da amostra de polímero a ser analisada, em um cadinho de alumínio. A metodologia de análise é composta por três ciclo de aquecimento e resfriamento na da faixa de 50 a 300°C, cujas rampas de temperatura eram de 10°C/min.

O primeiro ciclo de aquecimento de 50 a 300 °C foi aplicado para a eliminar a história térmica do material. O segundo ciclo de 300 a 50 °C, e o terceiro de 50 a 300 °C, foram utilizados para a determinação da temperatura e entalpia de cristalização, e temperatura e entalpia de fusão, respectivamente.

O grau de cristalinidade das amostras foi determinado segundo a Equação 3.1 que estabelece a razão entre a entalpia de fusão experimental (ΔH_f) e a entalpia teórica para um polímero 100% (ΔH_T), obtidas no “*thermal application notes*”¹⁸¹.

$$\%Cristalinidade = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_T} \times 100 \quad \text{Equação 3.2}$$

3.9 Análise estatística

Para a elaboração das planilhas dos planejamentos fatoriais fracionados, bem como a realização dos testes ANOVA para os experimentos de biossorção, quanto para os testes gravimétricos do experimento de biodegradação dos polímeros, foi utilizado o software Minitab® versão 18.1 e os gráficos foram gerados no software OriginPro® 2017, versão b9.4.0.220. Ambos os *softwares* foram alugados com licença de uso para estudantes¹⁸².

4 Resultados e discussões

4.1 Experimento de bioissorção de metais pesados pelo *Bacillus* sp. (LaBioMMi 1141)

4.1.1 Determinação das condições experimentais do planejamento fatorial do experimento de bioissorção de metais pesados.

O desenvolvimento do protocolo dos experimentos de bioissorção de metais pesados foi realizado com o auxílio de um planejamento fatorial (2^n) visando maximizar os dados sobre a influência das condições de cultivo sobre a taxa de bioissorção de metais do isolado LaBioMMi 1141 (*Bacillus* sp.). Previamente aos experimentos de avaliação de bioissorção de metais pesados, foram definidos os níveis dos fatores que seriam utilizados, para a definição do tempo de cultivo e a concentração dos metais presentes no meio de cultura. A Figura 3.3 ilustra a curva de crescimento para o isolado LaBioMMi 1141 em 3 condições distintas, (1) 262 mg/mL de Fe^{+3} , (2) 0,06 mg/mL de Cu^{2+} e (3) 175 mg/ml de Fe^{+3} e 0,04 mg/mL de Cu^{2+} .

Nessas condições de cultivo o microrganismo estava no meio da fase exponencial de crescimento com aproximadamente 48 horas de cultivo e com 120 horas já se encontrava na fase estacionária. Posteriormente à elaboração da curva de crescimento, foi determinada a concentração máxima de metal na qual o microrganismo conseguiu crescer e estabeleceu-se que em ambas as condições o valor poderia ser até 34% superior ao empregado na curva de crescimento.

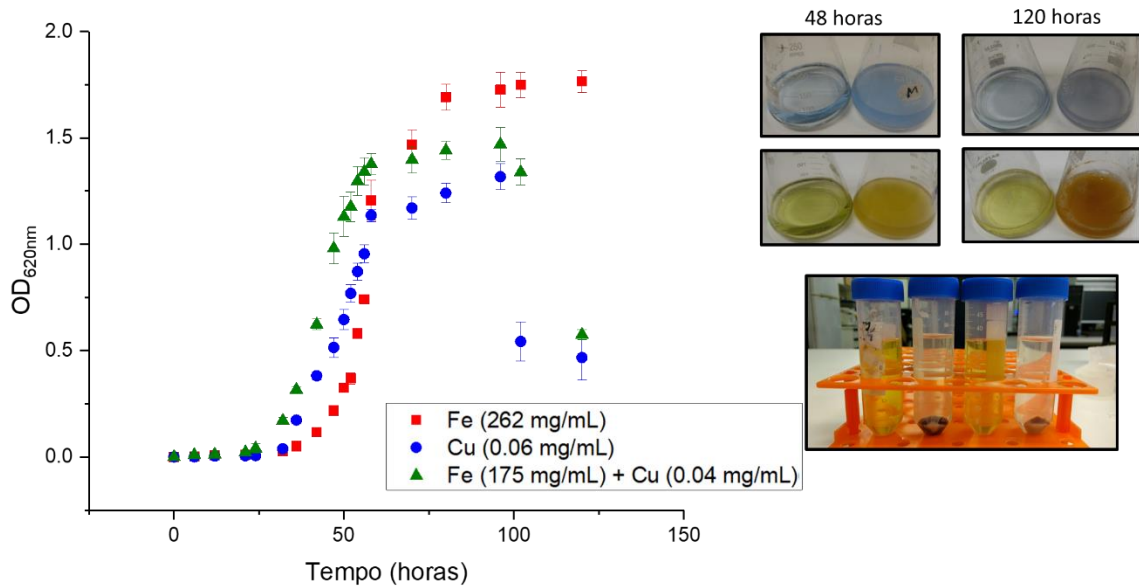


Figura 3.3. Curva de crescimento do isolado LaBioMMi 1141 (*Bacillus* sp.) em meios de cultura contendo os metais pesados Fe^{3+} e Cu^{2+} .

Conforme descrito para o *Bacillus medium*¹⁸³ o glicerol é a fonte de carbono e energia fornecida para o crescimento das bactérias. A fonte de nitrogênio provém do ácido glutâmico e do citrato de ferro amoniacal. O fosfato de potássio bibásico e o ácido cítrico são responsáveis pelo tamponamento do meio de cultura. Além disso, as condições ótimas de cultivo são pH 7,5 e temperatura de 35 a 37 °C¹⁸³.

A influência da alteração de alguns desses fatores, sobre a capacidade dos bioissorção de metais, também foi avaliada. Para tanto, o ácido glutâmico e a glutamina foram avaliados como fontes de nitrogênio e as condições de cultivo foram modificadas para que os valores de pH de 6,5 e 8,5 fossem avaliados, juntamente com as temperaturas de incubação de 25 e 35°C.

4.1.2 Análise do planejamento fatorial do experimento de bioissorção de metais pesados.

Para os experimentos de bioissorção foram selecionados 5 fatores e 2 níveis para se elaborar um planejamento fatorial fracionado $2^{(5-2)}$ em detrimento a um fatorial completo 2^5 , haja vista que seriam necessários 8 e 32 experimentos, respectivamente, para cada planejamento.

À medida que o número de fatores em um experimento fatorial 2^n aumenta, conseqüentemente cresce o número de experimentos e o número de

interações de ordem alta. Em termos probabilísticos, a chance dos efeitos principais e das interações de baixa ordem serem mais influentes sobre as repostas é maior do que a interação de vários efeitos. Além disso, algumas interações de ordem elevada apresentam combinações semelhantes e podem ser eliminadas sem que haja prejuízo a acurácia no modelo de respostas do planejamento fatorial.

Desse modo apenas uma fração de experimentos necessita ser realizada para obtenção das respostas¹⁸⁴ Portanto, foi elaborado um planejamento fatorial $2^{(5-2)}$ em triplicata, e as condições de cultivo, níveis de cada fator e as repostas estão descritos nas Tabela 3.5 e Tabela 3.6.

Tabela 3.5. Níveis dos fatores de cultivo estabelecidos pelo planejamento fatorial fracionado $2^{(5-2)}$.

Fonte de Nitrogênio	[Fe ³⁺]	[Cu ²⁺]	pH	Temperatura (°C)	Tempo (horas)
Glutamina	175	4	6.5	35	120
Ácido Glutâmico	175	4	6.5	25	48
Glutamina	350	8	6.5	25	120
Ácido Glutâmico	350	8	6.5	35	48
Glutamina	175	4	8.5	35	48
Ácido Glutâmico	175	4	8.5	25	120
Glutamina	350	8	8.5	25	48
Ácido Glutâmico	350	8	8.5	35	120

Tabela 3.6. Níveis dos fatores avaliados no planejamento fatorial fracionado $2^{(5-2)}$ e repostas obtidas para cada condição.

Variáveis independentes					Resultados [Fe ³⁺] (mg/mL)			Resultados [Cu ²⁺] (mg/mL)		
Fonte de nitrogênio	[M ^{x+}] (mg/mL)	pH	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	-1	-1	-1	1	0.3900	1.6664	0.4377	3.7236	3.8972	3.8958
-1	1	-1	-1	-1	151.2800	156.9618	154.6780	3.9412	4.0405	4.0000
1	-1	1	-1	-1	3.6005	1.1155	1.6596	8.0281	7.9792	8.0620
-1	1	1	-1	1	0.7345	0.8518	1.1727	7.8256	7.8283	7.8829
1	-1	-1	1	1	0.2768	0.3007	0.2980	4.0393	4.0493	4.0720
-1	1	-1	1	-1	157.2559	98.3547	72.1367	3.3954	3.3792	3.4960
1	-1	1	1	-1	276.5490	275.3741	275.9243	7.9584	7.9488	7.9012
-1	1	1	1	1	2.3306	0.9063	0.9250	7.9014	7.9953	8.0806

As Tabela 3.7 (a) e (b) apresentam os resultados do teste ANOVA para os planejamentos fatoriais fracionados de bioissorção de Fe^{3+} e Cu^{2+} . Para ambos os casos são listados os efeitos principais e combinados que influenciaram a bioissorção de Fe^{3+} e Cu^{2+} pela cepa de *Bacillus* sp. LaBioMMi 1141, haja vista que os mesmos apresentam valores de p inferiores ao valor de significância de 0.05 e desse modo a hipótese nula de que as médias dos efeitos são iguais deve ser rejeitada.

Adicionalmente, os gráficos de resíduos versus de ajustes e resíduos versus ordem, Figuras 1 a 4 presentes no apêndice, para os dois planejamentos estão compatíveis com o esperado para um modelo bem ajustado, pois o primeiro se apresenta aleatoriamente distribuído entre o zero e o segundo não apresenta nenhum padrão de distribuição.

Por fim, os valores de S , R^2 e R^2_{predito} também demonstram o ajuste do modelo. Os valores de S observados para os modelos foram de 15,4589 para o Fe^{3+} e 0,0597 para Cu^{2+} , demonstrando que os modelos descrevem bem as respostas, embora a dispersão dos dados para o Fe^{3+} esteja mais elevada que a observada para o modelo do Cu^{2+} .

Os valores de R^2 e R^2_{predito} são altos, sendo 98,32 e 96,23 para o Fe^{3+} , respectivamente, e 99,94 e 99,88 para o Cu^{2+} , demonstrando a boa acurácia e capacidade de predição dos modelos gerados.

Tabela 3.7. Resultado do teste ANOVA para os planejamentos fatoriais, sendo a) relativo à bio sorção de Fe^{3+} e b) relativo à bio sorção de Cu^{2+} .

a)

Análise de Variância					
Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	224297	32042	134.08	0
Linear	5	166286	33257	139.16	0
Fonte de Nitrogênio	1	67	67	0.28	0.605
[Fe3+]	1	92	92	0.39	0.543
pH	1	19613	19613	82.07	0
Temperatura	1	108622	108622	454.53	0
Tempo	1	37892	37892	158.56	0
Interações de 2 fatores	2	58011	29005	121.37	0
[Fe3+]*pH	1	38373	38373	160.57	0
[Fe3+]*Tempo	1	19638	19638	82.17	0
Erro	16	3824	239		
Total	23	228120			

b)

Análise de Variância					
Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	102.719	14.674	4119.95	0
Linear	5	102.265	20.453	5742.44	0
Fonte de Nitrogênio	1	0.133	0.133	37.42	0
[Fe3+]	1	101.938	101.938	28620.41	0
pH	1	0.033	0.033	9.21	0.008
Temperatura	1	0.047	0.047	13.18	0.002
Tempo	1	0.114	0.114	31.99	0
Interações de 2 fatores	2	0.454	0.227	63.74	0
[Fe3+]*pH	1	0.065	0.065	18.18	0.001
[Fe3+]*Tempo	1	0.389	0.389	109.29	0
Erro	16	0.057	0.004		
Total	23				

A Figura 3.4 ilustra os efeitos padronizados para os experimentos de bioissorção de Fe^{3+} e Cu^{2+} . Pode-se observar na Figura 3.4 a) que os principais efeitos que influenciam a taxa de bioissorção de Fe^{3+} são: temperatura de incubação, interação entre a concentração de Fe^{3+} e pH, tempo de cultivo, fonte de nitrogênio, interação entre concentração de Fe^{3+} e tempo e por fim o pH, sendo a temperatura de incubação o mais influente e o pH o de menor influência.

Na Figura 3.4 b) os principais efeitos são: concentração de Cu^{2+} , interação da concentração de Cu^{2+} e temperatura, fonte de nitrogênio, temperatura, interação da concentração de Cu^{2+} e pH, tempo, pH, sendo o pH o parâmetro menos influente.

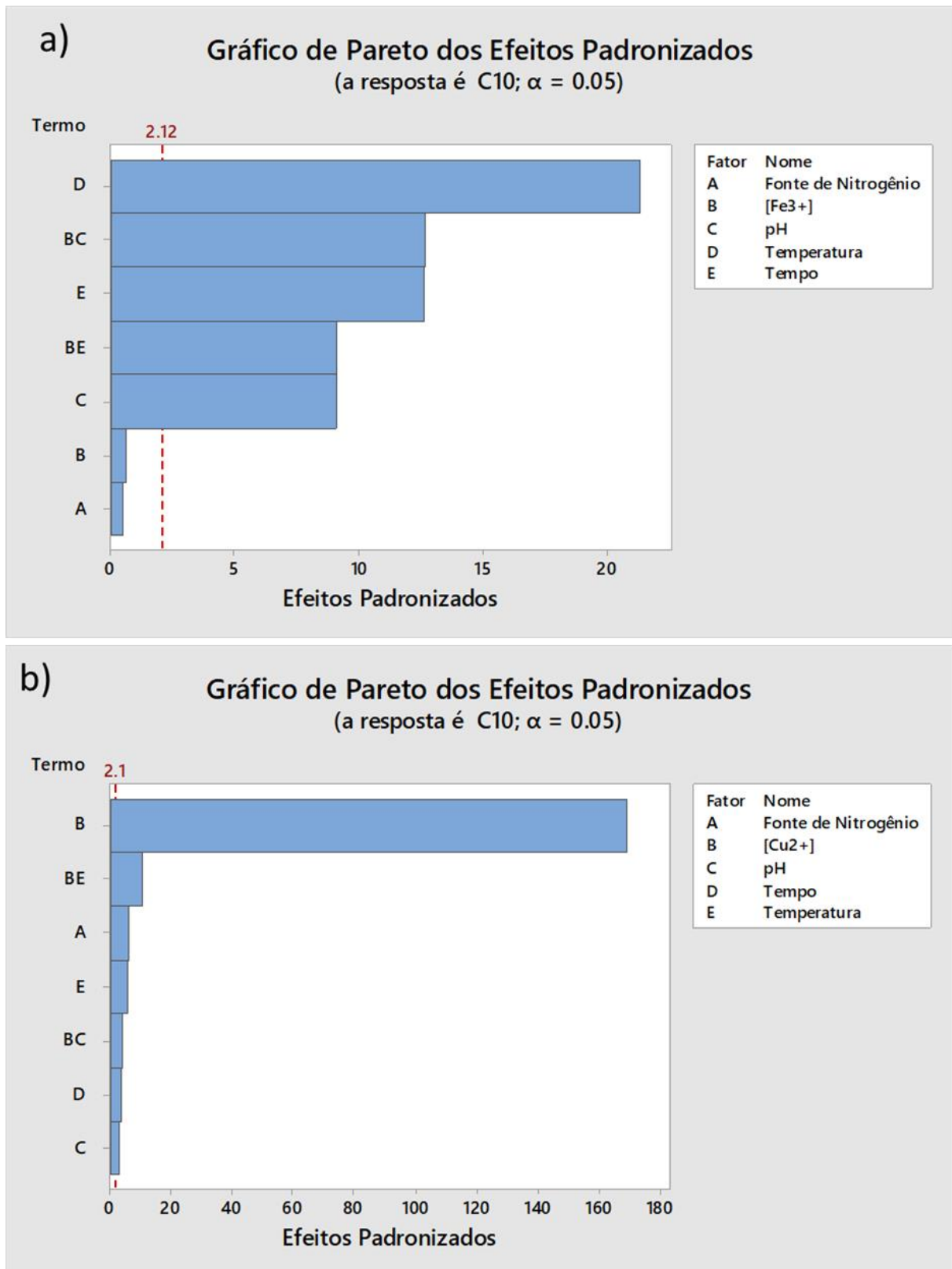


Figura 3.4. Gráficos de Pareto para os efeitos padronizados do planejamento fatorial fracionado para biossorção de a) Fe³⁺ e b) Cu²⁺.

Os níveis de influência de cada um dos efeitos estudados para biossorção de Fe³⁺ e Cu²⁺ são demonstrados na Figura 3.5. Nesses gráficos as

melhores condições dos efeitos estudados ocorram quando eles propiciam menores valores de média, visto que tal resultado indica menor concentração de Fe^{3+} e Cu^{2+} no meio de cultura.

Na Figura 3.5 a) pode-se observar que a troca do ácido glutâmico pela glutamina na composição do meio de cultura, juntamente com alterações na concentração de Fe^{3+} , pouco influenciaram a taxa de bioabsorção desse metal. Já o pH propicia a maior bioabsorção com maiores valores, esse fato pode ser devido à diferença de biodisponibilidade de íon Fe^{3+} e na toxicidade do meio.

Em pH mais básico, os íons Fe^{3+} tendem a ficar na forma de $\text{Fe}(\text{OH})_3$, de forma que nessas condições a toxicidade do meio diminui. O efeito da temperatura quando no nível máximo induz maior taxa de bioabsorção, pois essa condição se aproxima da condição ótima de crescimento do microrganismo. Por fim, tempos de cultivo menores, são o suficiente para a remoção de boa parte do conteúdo de metal do meio.

Na Figura 3.5 b), o único efeito relevante sobre a taxa de bioabsorção é a concentração de Cu^{2+} . Em menores concentrações ocorre a maior bioabsorção do metal do meio de cultura, provavelmente pela menor toxicidade nessas condições de cultivo. Os parâmetros pH, tempo, temperatura e a fonte de nitrogênio apresentaram baixa alteração na taxa de bioabsorção.

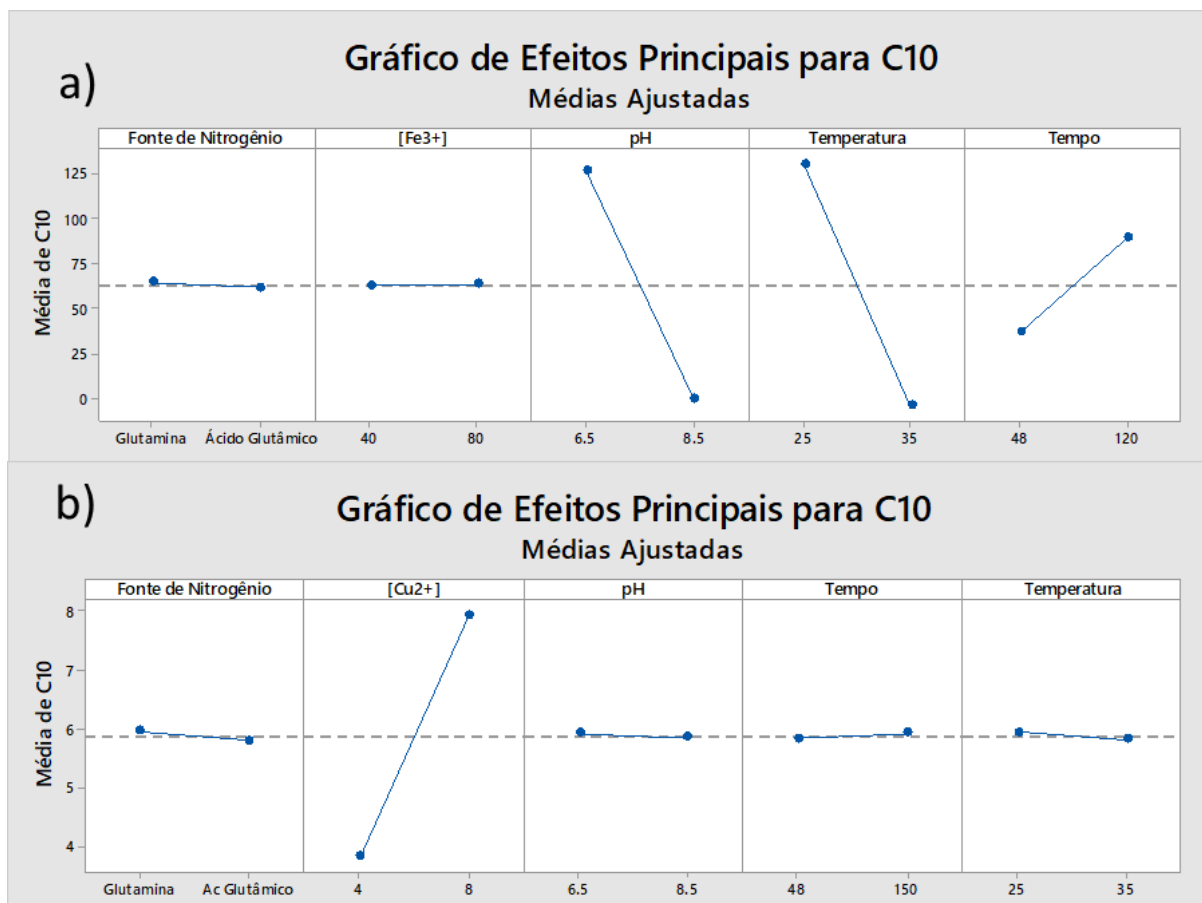


Figura 3.5. Médias ajustadas da influência dos efeitos sobre a bio sorção de a) Fe³⁺ e b) Cu²⁺.

A Figura 3.6 ilustra a influência das interações entre efeitos sobre a bio sorção dos metais. Na Figura 3.6 a), pode-se observar que a interação de valores de pH menores com ambas as concentrações de Fe³⁺ apresenta médias muito superiores às observadas para os valores máximos do efeito pH. Reforçando a constatação de que o cultivo em pH 8.5 favorece a bio sorção dos íons Fe³⁺ em ambas as concentrações avaliadas.

Também se observa que para ambas as concentrações de Fe³⁺ o menor período de incubação apresentou ligeira vantagem frente ao período de máximo avaliado. Contudo em termos de aplicabilidade, menores tempos favorecem maior rotatividade no processo de biorremediação.

Com relação à Figura 3.6 b) a interação entre Cu²⁺ e pH parece ser governada majoritariamente pela concentração do metal. Menores concentrações de Cu²⁺, tanto em pH 6,5 quanto em pH 8,5 promovem o aumento da taxa de bio sorção, provavelmente pela menor toxicidade do meio de cultura. A interação entre concentração de Cu²⁺ e temperatura também é governada pela concentração do

metal. Em ambas as condições dos tempos de incubação, a menor concentração de Cu^{2+} também propiciou maior taxa de biossorção.

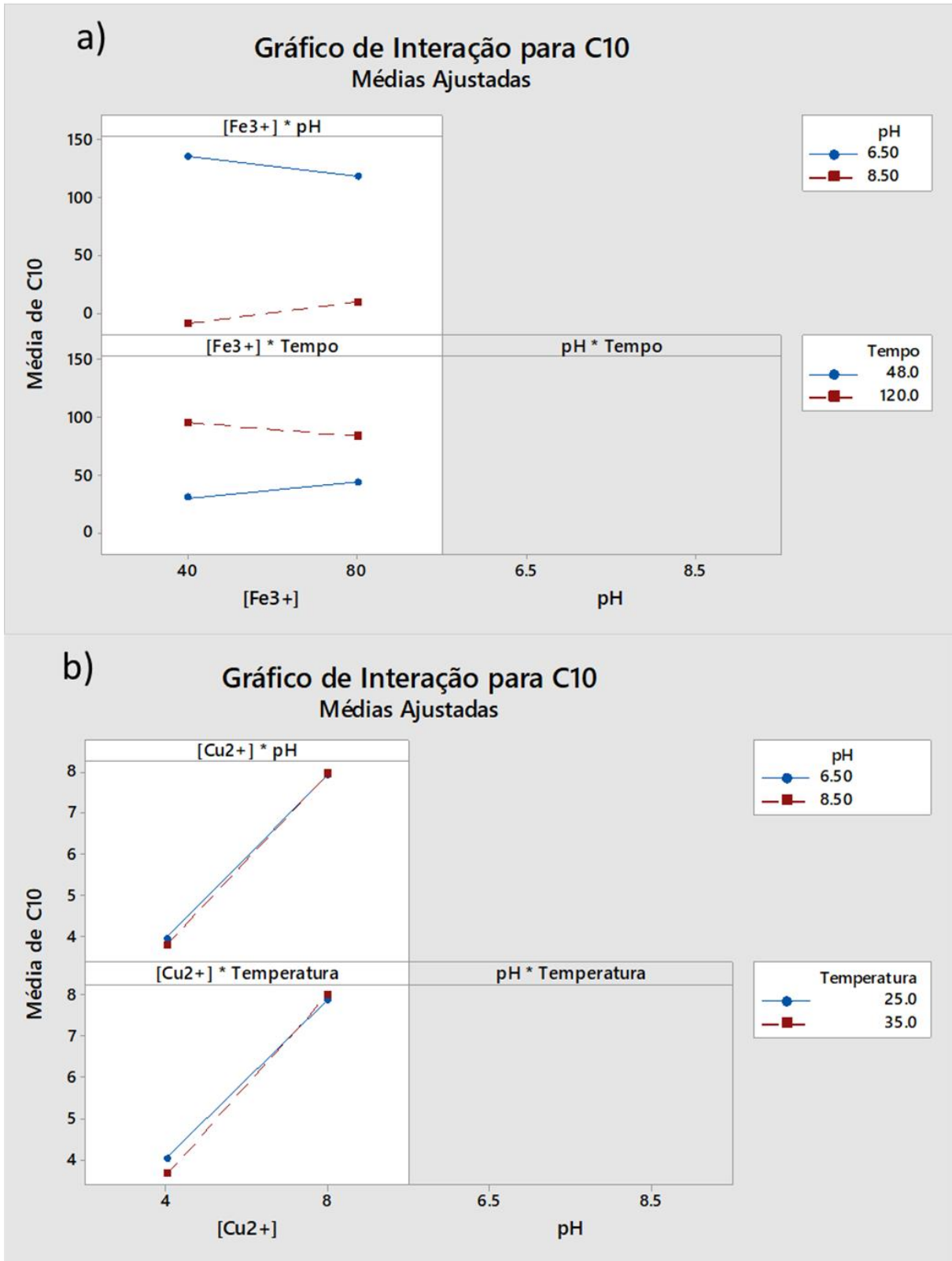


Figura 3.6 Médias ajustadas da influência das interações sobre a biossorção de a) Fe^{3+} e b) Cu^{2+} .

Para o experimento de bioissorção conjunta de Fe^{3+} e Cu^{2+} foi elaborado um planejamento fatorial $2^{(6-2)}$ em triplicata, sem que houvesse prejuízo nas repostas. Os mesmos efeitos e níveis anteriores foram analisados, com exceção da concentração de Fe^{3+} que foi alterada para os níveis de 115 e 230 mg/mL. As condições de cultivo, níveis de cada fatores e as respostas obtidas podem ser observados nas Tabela 3.8.

Tabela 3.8. Níveis dos fatores de cultivo estabelecidos pelo planejamento fatorial fracionado $2^{(6-3)}$.

Variáveis independentes					Resultados [Fe^{3+}] (mg/mL)			Resultados [Cu^{2+}] (mg/mL)		
Fonte de nitrogênio	[Fe^{3+}] (mg/mL)	pH	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	-1	-1	-1	1	106.6323	105.8241	108.0322	4.0317	3.9720	4.1047
1	1	-1	-1	-1	108.7455	107.7393	102.4074	4.1028	3.9597	4.0065
1	-1	1	-1	-1	218.2078	217.3499	213.4101	3.9899	3.9552	3.9405
1	1	1	-1	1	220.1872	217.1147	218.7911	3.9998	4.0550	3.9905
1	-1	-1	1	1	112.5260	113.4499	110.9302	8.0280	8.0575	7.7761
1	1	-1	1	-1	104.7494	107.3492	104.9949	7.7432	7.8927	7.9320
1	-1	1	1	-1	240.9325	234.8290	227.7480	7.9648	7.9825	7.8187
1	1	1	1	1	206.8021	227.6016	215.6043	7.7191	8.0953	7.6790

As Tabela 3.9 a) e b) ilustram os resultados do teste ANOVA para as respostas de bioissorção de Fe^{3+} e Cu^{2+} no experimento de bioissorção conjunta. Para a bioissorção de Fe^{3+} os efeitos que influenciaram essa resposta foram a fonte de nitrogênio, concentração de Fe^{3+} , concentração de Cu^{2+} e temperatura, respectivamente. Para o experimento de bioissorção de Cu^{2+} o único efeito com influência significativa foi a concentração desse metal no meio de cultura. Contudo, ao se observar os valores de S, R^2 e R^2_{predito} é possível perceber a baixa acurácia e ajuste do modelo.

Embora os valores observados para S sejam baixos e demonstrem baixa dispersão dos dados (2,32 para o Fe^{3+} e 1,66 para Cu^{2+}), os valores de R^2 e R^2_{predito} não são altos (73,00 e 61,19 para o Fe^{3+} e 36,85 e 9,22 para o Cu^{2+}), demonstrando a má acurácia e predição do modelo gerado.

Tabela 3.9. Resultado do teste ANOVA para o planejamento fatorial conjunto, sendo a) relativo à resposta de bioissorção de Fe^{3+} e b) relativo a resposta de bioissorção de Cu^{2+} .

a)

Fonte	GL	SQ(Aj.)	QM(Aj.)	Valor F	Valor P
Modelo	7	232.653	33.2362	6.18	0.001
Linear	6	228.043	38.0071	7.07	0.001
Fonte de Nitrogênio	1	62.662	62.6623	11.65	0.004
[Fe3+]	1	40.625	40.6252	7.55	0.014
[Cu2+]	1	47.546	47.5461	8.84	0.009
pH	1	0.1	0.0997	0.02	0.893
Temperatura	1	74.2	74.2003	13.8	0.002
Interações de 2	2	2.909	2.9093	0.54	0.473
Fonte de Nitr.*Temp.	1	4.611	4.6106	0.86	0.368
Erro	16	4.611	4.6106	0.86	0.368
Total	23	86.048	5.378		

b)

Fonte	GL	SQ(Aj.)	QM(Aj.)	Valor F	Valor P
Modelo	7	25.7278	3.6754	1.33	0.298
Linear	5	24.8041	4.134	1.5	0.24
Fonte de Nitrogênio	1	0.6909	0.6909	0.25	0.623
[Fe3+]	1	2.8595	2.8595	1.04	0.324
[Cu2+]	1	15.1936	15.1936	5.51	0.032
pH	1	1.1439	1.1439	0.42	0.529
Temperatura	1	4.2392	4.2392	1.54	0.233
Interações de 2	2	0.6769	0.6769	0.25	0.627
Fonte de Nitr.*Temp.	1	0.9237	0.9237	0.34	0.571
Erro	16	0.9237	0.9237	0.34	0.571
Total	23	44.0909	2.7557		

Diante disso, os dados das concentrações de Fe^{3+} e Cu^{2+} foram combinados para a obtenção de uma única resposta e o modelo para o planejamento fatorial fracionado $2^{(6-3)}$ foi gerado novamente (Tabela 3.10).

Nesse novo modelo os únicos efeitos que influenciaram a taxa de bioissorção dos metais foram a concentração de Fe^{3+} e Cu^{2+} , visto que apenas esses parâmetros apresentaram valores de p inferiores a 0,05. Dessa vez, ao se observar

os valores de S , R^2 e R^2_{predito} foi possível verificar boa acurácia e ajuste do modelo. O valor observado para S foi 0,1201 e demonstra baixa dispersão dos dados, os valores de R^2 e R^2_{predito} foram altos, 99,71 e 99,34, respectivamente, demonstrando a excelente acurácia e predição do modelo.

Adicionalmente, os gráficos de resíduos versus de ajustes e resíduos versus ordem, (Figuras 1 a 4 do apêndice), para os dois planejamentos estão compatíveis com o esperado para um modelo bem ajustado, pois o primeiro se apresenta aleatoriamente distribuído entre o zero e o segundo não apresenta nenhum padrão de distribuição.

Tabela 3.10. Resposta combinada do planejamento fatorial conjunto, sendo a) tabela com as respostas e b) resultados do teste ANOVA.

a)

Variáveis independentes					Concentração combinada		
Fonte de nitrogênio [M ^{x+}] (mg/mL)	pH	Temperatura (°C)	Tempo (horas)		R1	R2	R3
1	-1	-1	-1	1	3.884818	3.828308	3.95445
-1	1	-1	-1	-1	3.953635	3.81933	3.855655
1	-1	1	-1	-1	3.918255	3.884512	3.86906
-1	1	1	-1	1	3.928438	3.980654	3.919022
1	-1	-1	1	1	7.649986	7.523184	7.266711
-1	1	-1	1	-1	7.210213	7.352144	7.374855
1	-1	1	1	-1	7.709924	7.720073	7.559189
-1	1	1	1	1	7.441344	7.817257	7.414909

b)

Análise de Variância					
Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	78.1215	11.1602	773.62	0
Linear	6	78.1215	13.0202	902.55	0
Fonte de Nitrogênio	1	0.0205	0.0205	1.42	0.251
[Fe³⁺]	1	0.0924	0.0924	6.41	0.022
[Cu²⁺]	1	77.9172	77.9172	5401.17	0
pH	1	0.0061	0.0061	0.42	0.525
Tempo	1	0.0365	0.0365	2.53	0.131
Temperatura	1	0.0488	0.0488	3.38	0.085
Interações de 2 fatores	1	0	0	0	0.989
Fonte de Nitrogênio*Temperatura	1	0	0	0	0.989
Erro	16	0.2308	0.0144		
Total	23	78.3523			

A Figura 3.7 demonstra os efeitos padronizados para o experimento de biossorção conjunta de Fe³⁺ e Cu²⁺. Os principais efeitos que influenciaram a taxa de biossorção foram: a concentração de Cu²⁺ e a concentração de Fe³⁺.

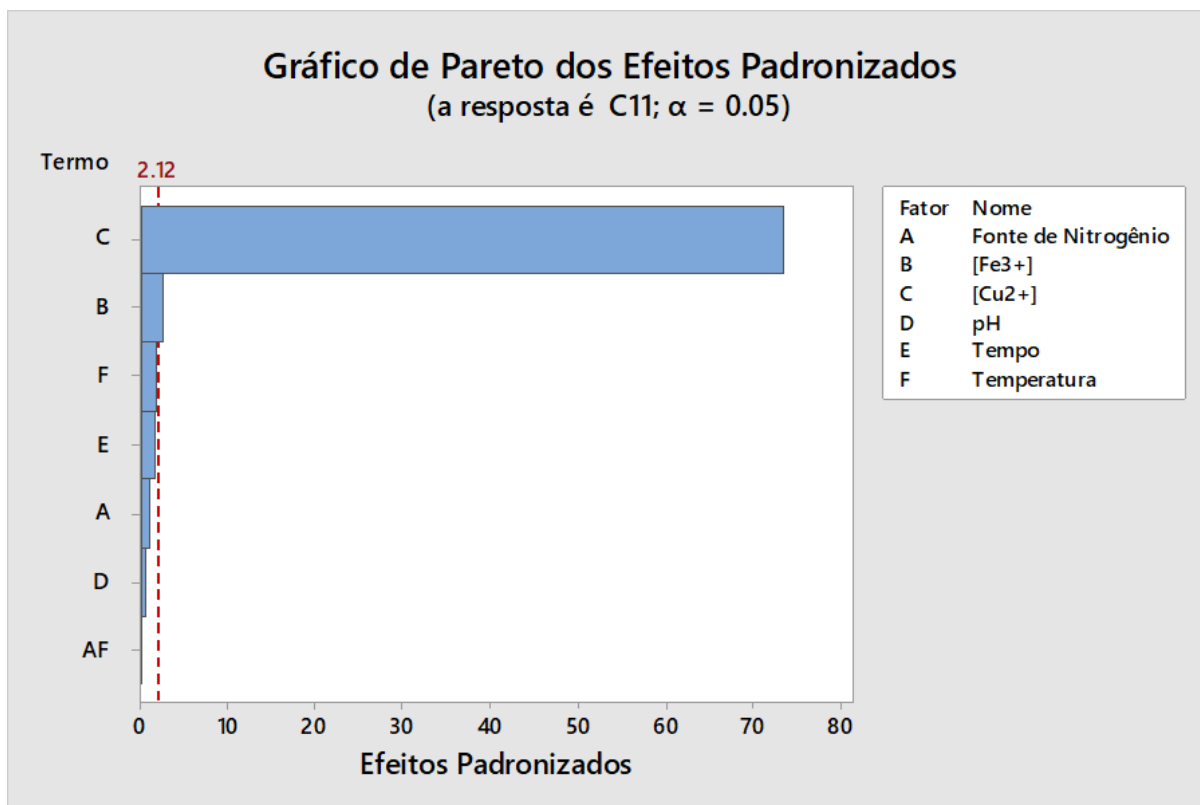


Figura 3.7. Gráficos de Pareto para os efeitos padronizados para bioissorção de Fe^{3+} e Cu^{2+} no planejamento fatorial do experimento de bioissorção conjunta.

Os níveis de influência de cada um dos efeitos estudados para bioissorção conjunta de Fe^{3+} e Cu^{2+} estão demonstrados na Figura 3.8. A bioissorção dos metais é gerida pela concentração dos mesmos e provavelmente pela competição na formação dos complexos do sideróforo com Fe^{3+} e Cu^{2+} . Embora a concentração de íon Fe^{3+} seja pouco influente na taxa de bioissorção dos metais, em um contexto geral pode-se observar que menores concentrações dos íons desses metais favorecessem a diminuição do conteúdo de metais presente no meio de cultura, provavelmente porque tais condições são mais favoráveis ao crescimento da biomassa.

Adicionalmente, fatores relacionados ao metabolismo secundário e a excreção de substâncias pelos microrganismos pode atuar na retirada desses metais por outras rotas sem ser pela bioissorção dos mesmos, precipitação com outras moléculas sideróforas como surfactina e iturina depende de como o microrganismo modula seu metabolismo para se adequar às pressões do meio.

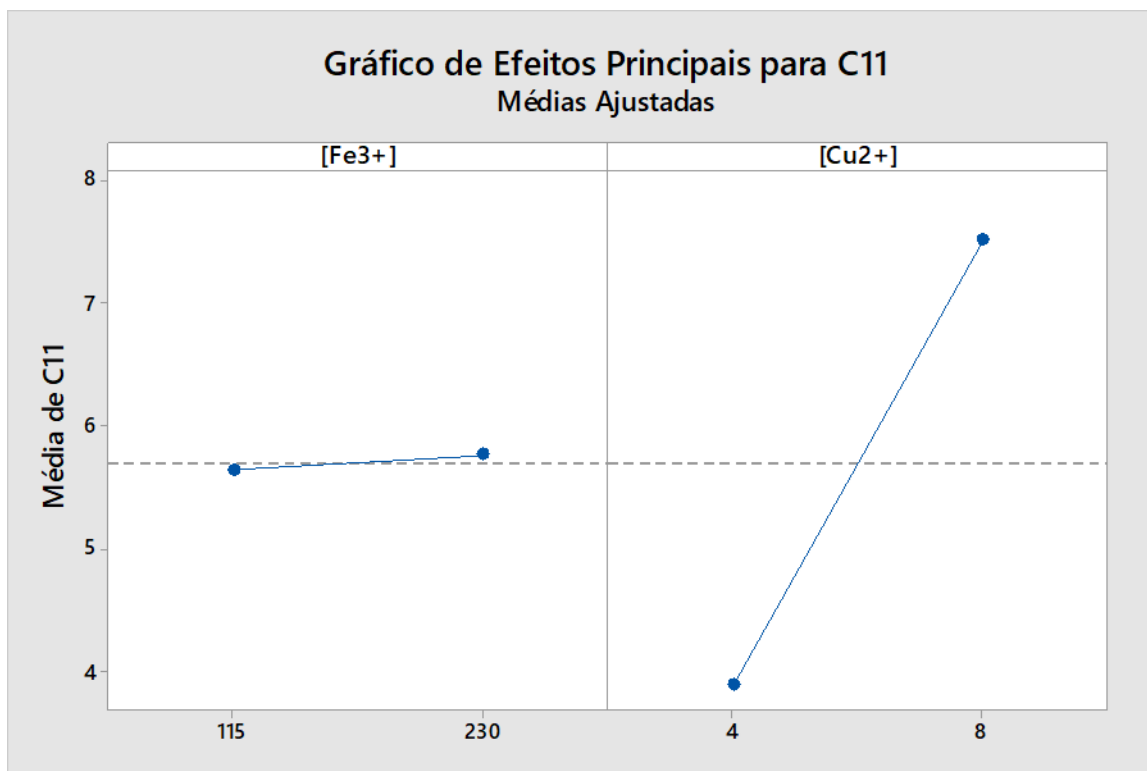


Figura 3.8. Médias ajustadas da influência dos efeitos sobre a bioissorção de a) Fe^{3+} e b) Cu^{2+} no planejamento fatorial do experimento de bioissorção conjunta.

4.1.3 Análise dos espectros de MALDI TOF-MS das células intactas do LaBioMMi 1141 (*Bacillus* sp.) submetido aos experimentos de bioissorção de Fe^{3+} e Cu^{2+} .

Ao final dos experimentos determinados pelo planejamento fatorial além da dosagem da concentração residual de metais no meio de cultura, também foi avaliado o espectro de massas de MALDI TOF-MS, no modo positivo de aquisição de íons, na região de 650 a 3500 Da, para as células dos microrganismos avaliados. Como ferramenta no auxílio no tratamento de dados, e na busca de alterações no perfil de metabolitos na região avaliada, foi utilizada a ferramenta de PCA disponível no pacote Biotyper. A Figura 3.9 demonstra os resultados obtidos do gráfico de *scores* e *loadings* para os espectros do LaBioMMi 1141 (*Bacillus* sp.) cultivados em diferentes concentrações de Fe^{3+} . O gráfico gerado pode explicar bem a separação observada para o sistema, haja vista que a componente principal 1 (PC1) é composta por mais de 70% da variância total do sistema. Ao se analisar a dispersão das amostras no gráfico de *scores* pode-se distinguir a formação de dois grupos. Os mesmos foram separados com relação a concentração de Fe^{3+} do meio de cultura, sendo que um dos grupos era composto por microrganismos cultivados em 350 mg/mL e o outro em 175

mg/mL. Quando se compara o gráfico de PCA com o de *loadings* é possível e a associação dos íons que servem como marcadores químicos para distinguir os grupos. O grupo dos microrganismos cultivados em 350 mg/mL distingue-se por marcadores presentes nas regiões de 880 a 930 Da e 960 e 990 Da enquanto o grupo cultivado em 175 mg/mL distingue-se por marcadores na região de 600 a 700 Da.

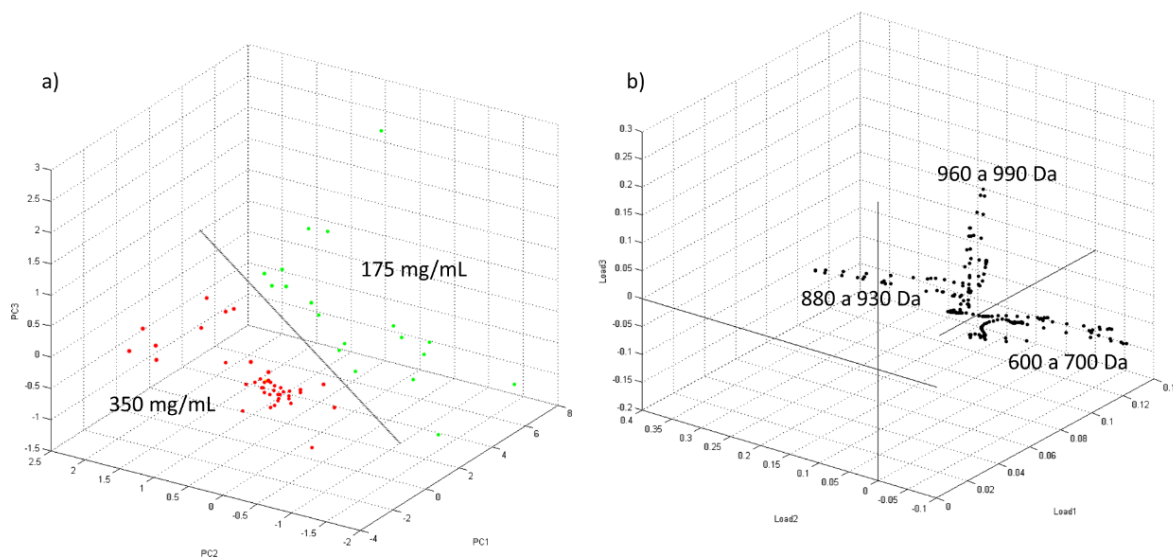


Figura 3.9. Gráfico de a) PCA e b) Loadings para os espectros de MALDI TOF-MS das células intactas do LaBioMMi 1141 (*Bacillus* sp.) no experimento de bioacumulação de Fe^{3+} .

Contudo, para o experimento de bioacumulação de Cu^{2+} não foi possível observar um padrão que possa ser associado com as condições de cultivo do microrganismo. A Figura 3.10 demonstra o gráfico de *scores* e *loadings* dos espectros de MALDI TOF-MS dos microrganismos cultivados no meio de cultura contendo diferentes concentrações de Cu^{2+} . Embora a variância explicada pelas componentes principais seja elevada, aproximadamente 80% na PC1, observa-se apenas um agrupamento composto por espectros de microrganismos cultivados a 0,04 mg/mL de Cu^{2+} e outro agrupamento composto por uma mistura de microrganismos cultivados a 0,04 e 0,08 mg/mL de Cu^{2+} .

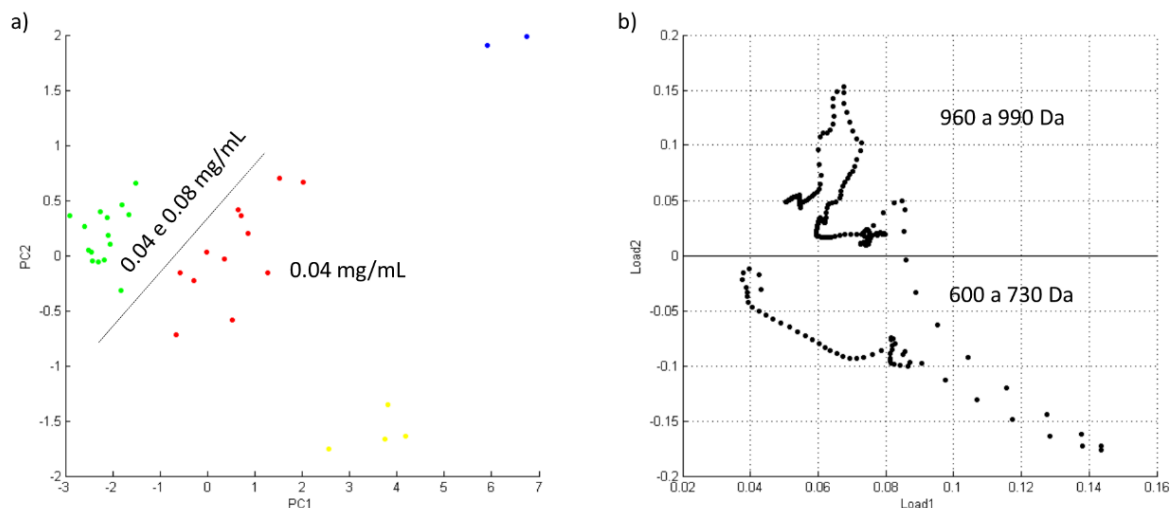


Figura 3.10 Gráfico de a) *scores* e b) *loadings* para os espectros de MALDI TOF-MS das células intactas do LaBioMMi 1141 (*Bacillus* sp.) no experimento de biossorção de Cu^{2+} .

Com base na região de massa, determinada pelo PCA, para os microrganismos crescidos em condições com alta concentração de Fe^{3+} , foi realizada a busca de moléculas sideroforas que seriam condizentes com essa região. A Figura 3.11 ilustra a molécula da bacillibactina, a qual é atribuída a mediação do transporte de íons Fe^{3+} para dentro das células do microrganismo, e o processo pelo qual ocorre a captura de íons Fe^{3+} do meio de cultura e transporte para o interior da célula.¹⁸⁵. Embora as massas da mesma e do complexo dela com íons Fe^{3+} estejam dentro da região estabelecida pelo PCA, $[\text{M}+\text{H}]^+$ igual a 883 Da e $[\text{M}-2\text{H}+\text{Fe}^{3+}]^+$ igual a 935 Da, nenhum desses marcadores foi observado nos espectros. Contudo, os sinais referentes a Bacillibactina hidrolisada e o complexo ferri-Bacillibactina hidrolisada foram observados, $[\text{M}+\text{H}]^+$ igual a 900 Da e $[\text{M}-2\text{H}+\text{Fe}^{3+}]^+$ igual a 954 Da. Além disso, a Figura 3.12 ilustra a estrutura do complexo ferri-Bacillibactina formado durante o processo de transporte do metal para o interior da célula.

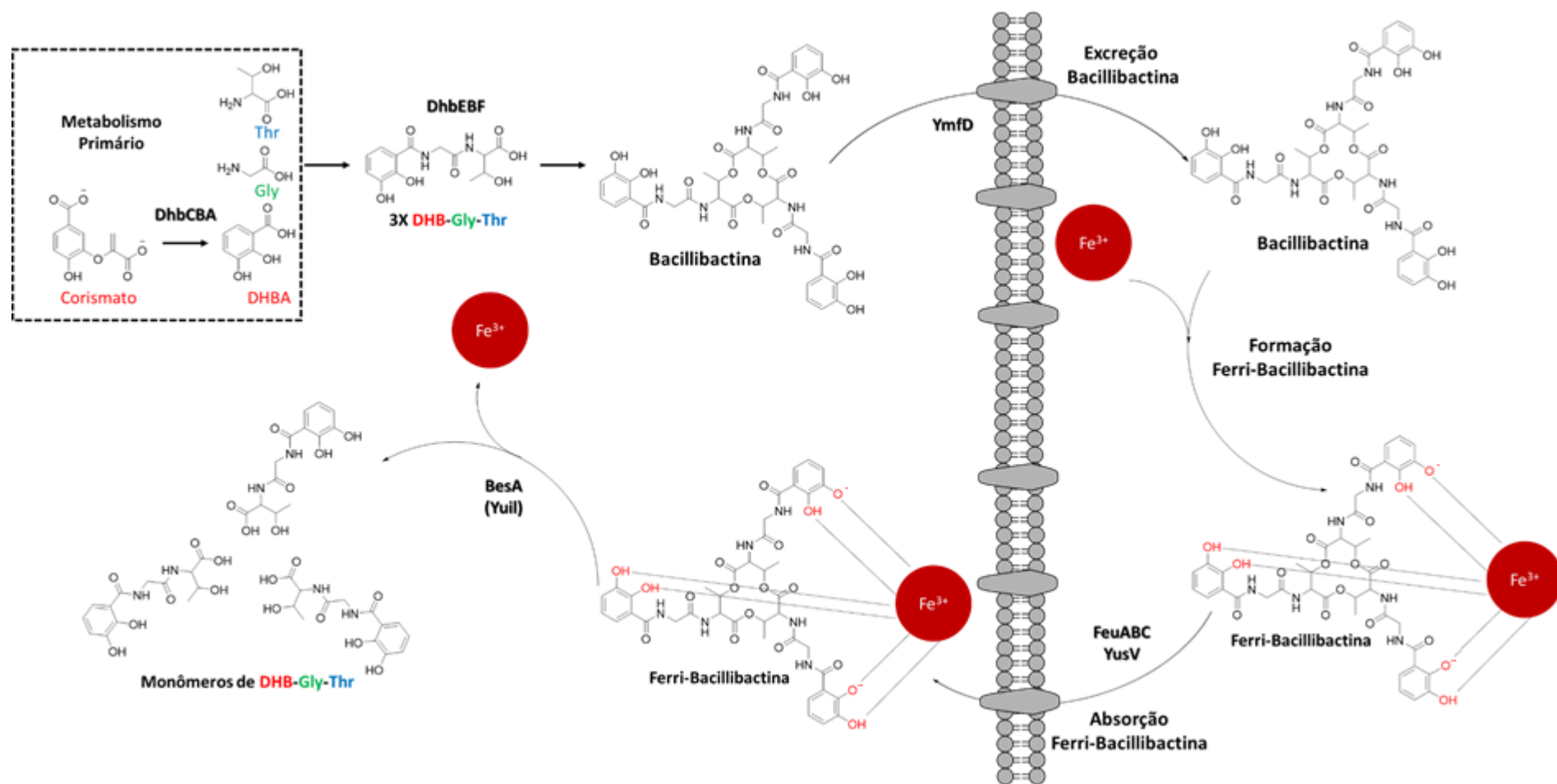


Figura 3.11. Esquema da complexação da Bacillibactina com íons Fe³⁺ e transporte para o interior da célula.

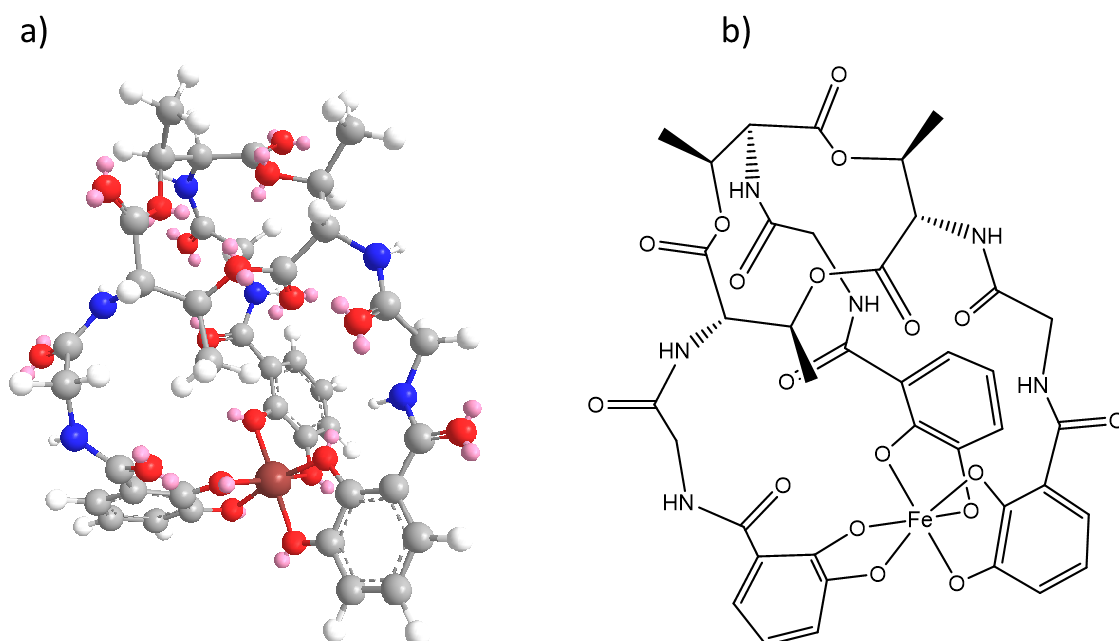


Figura 3.12 Ilustração do complexo ferri-Bacillibactina.

Em 2006, Miethke et al. condensaram as várias etapas descritas anteriormente em uma rota para aquisição de Fe^{3+} pelas células do microrganismo¹⁸⁶. Onde a biossíntese da Bacillibactina ocorre no interior da célula a partir da condensação de unidades de ácido 2,3-dihidroxi-benzóico (DBH), Glicina e Treonina para a formação da trilactona a partir de três unidades do catecol (2,3-dihidroxi-benzoato-glicina-treonina). Quando sintetizada a Bacillibactina é excretada para o meio, onde se complexa com íons ferro e possibilita a passagem desses pela membrana celular do microrganismo. No citosol, o anel trilactônico é hidrolisado novamente em 3 unidades de catecol (2,3-dihidroxi-benzoato-glicina-treonina) e os íons Fe^{3+} são liberados.

Como não foi possível o isolamento e fragmentação via dissociação por colisão (*Collision-induced dissociation*), dos íons majoritários presentes nos espectros adquiridos, haja visto que os mesmos foram adquiridos diretamente das células intactas do microrganismo e abundância muitas vezes não era elevada, um padrão de fragmentação da Bacillibactina hidrolisada, trímero do catecol (2,3-dihidroxi-benzoato-glicina-treonina), foi proposto com o intuito de se buscar íons marcadores de metabólito, na fragmentação ocorrida na fonte (*Post-source decay*). A Figura 3.13 ilustra o esquema de fragmentação proposto para a Bacillibactina após sofrer a hidrólise, adicionalmente também foi calculada a massa do complexo do trímero do

catecol (2,3-dihidroxibenzoato-glicina-treonina) complexado com Fe^{3+} . Primeiramente, há a liberação de 2,3-hidroxibenzamida como perda neutra, cuja massa é 153 Da, do íon do trímero do catecol (2,3-dihidroxibenzoato-glicina-treonina), cuja massa é 901 Da, para originar o íon 748 Da. Então, nesse íon há uma migração de hidrogênio, seguida de um rearranjo para então ocorrer a perda neutra de 3-metiloxiaziridina, cuja massa é 53 Da, e obtermos o fragmento cuja massa é igual 691 Da. O íon de 691 Da sofre duas fragmentações seguindo do rearranjo do tipo McLafferty para na primeira etapa ocorrer a liberação de CO_2 , 44 Da, e na segunda a liberação de propadieno, 40 Da, e obter o dímero do catecol (2,3-dihidroxibenzoato-glicina-treonina), cuja massa é igual a 607 Da.

3

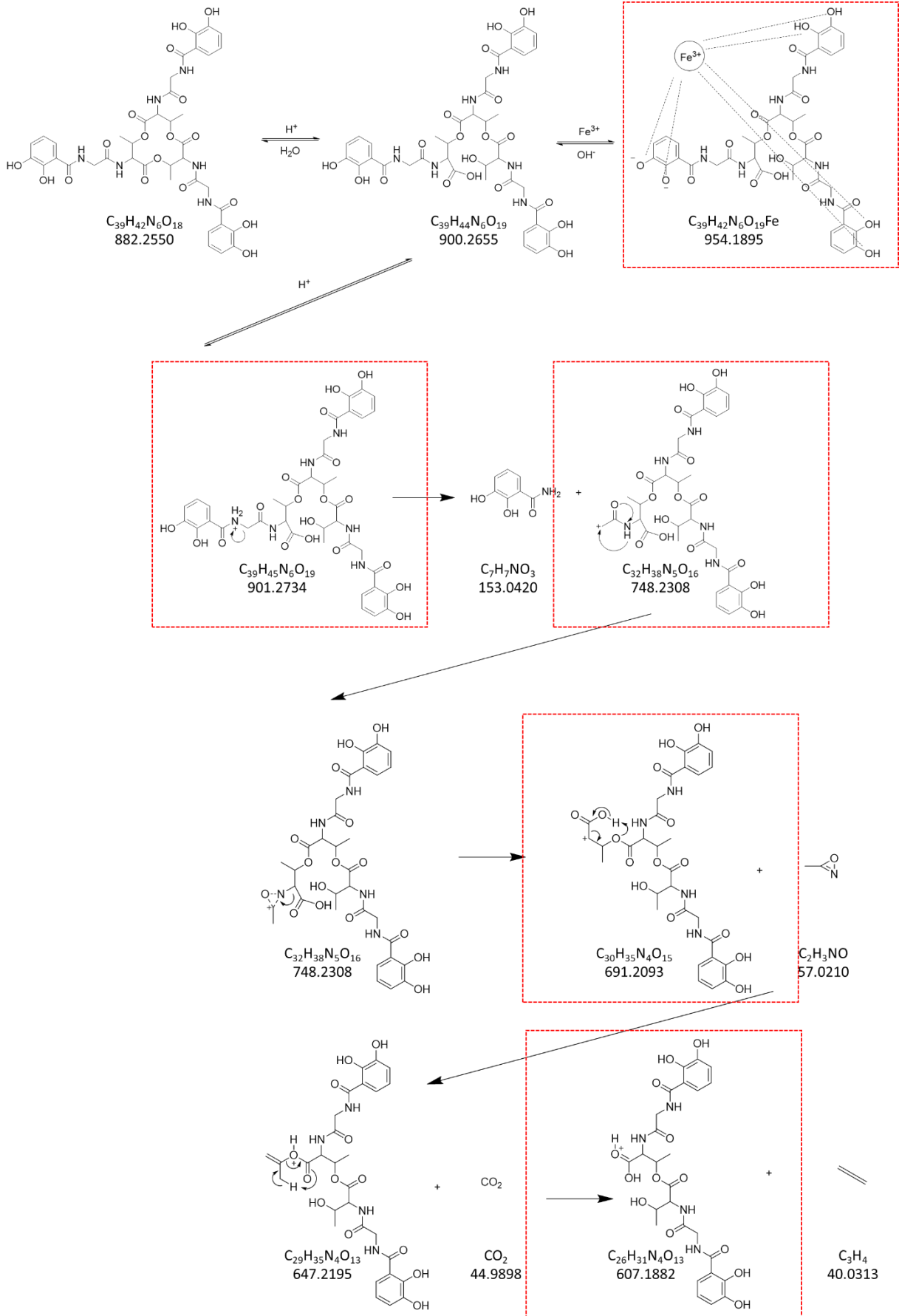


Figura 3.13. Esquema da proposta de fragmentação na fonte (PSD) da Bacillibactin.

Nas Figura 3.14 e Figura 3.15 são ilustrados os espectros de MALDI TOF-MS, adquiridos no modo positivo de aquisição de íons, do microrganismo LaBioMMi 1141 (*Bacillus* sp.) sendo que as Figura 3.14 a) e b) representam o microrganismo cultivado em 350 e 175 mg/mL de Fe^{3+} , respectivamente, e as Figura 3.15 a) e b) correspondem as concentrações de 0,08 e 0,04 mg/mL de Cu^{2+} , respectivamente.

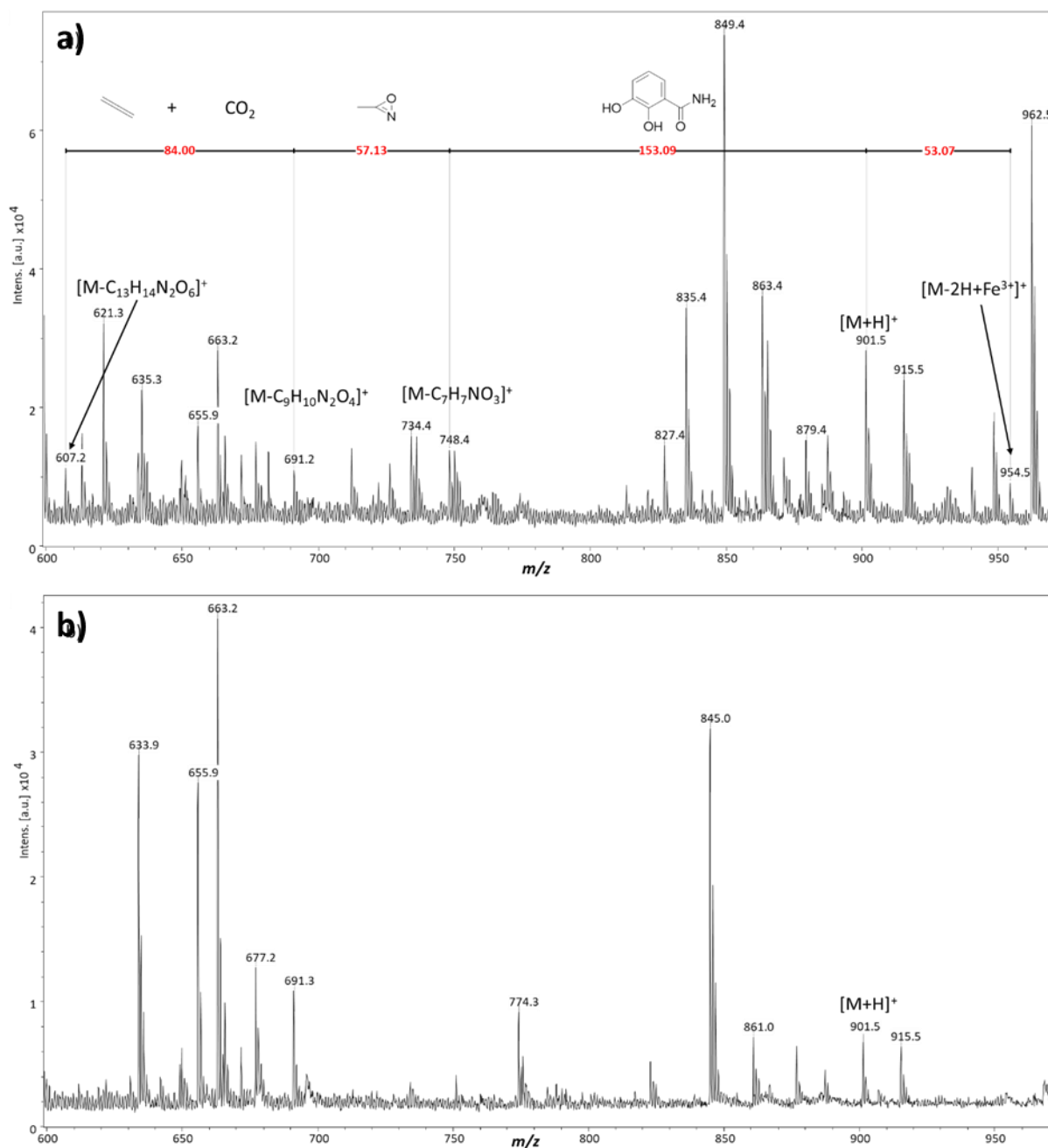


Figura 3.14. Espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, do isolado LaBioMMi 1141 (*Bacillus* sp.) cultivado em a) 350 mg/mL de Fe^{3+} e b) 175 mg/mL de Fe^{3+} .

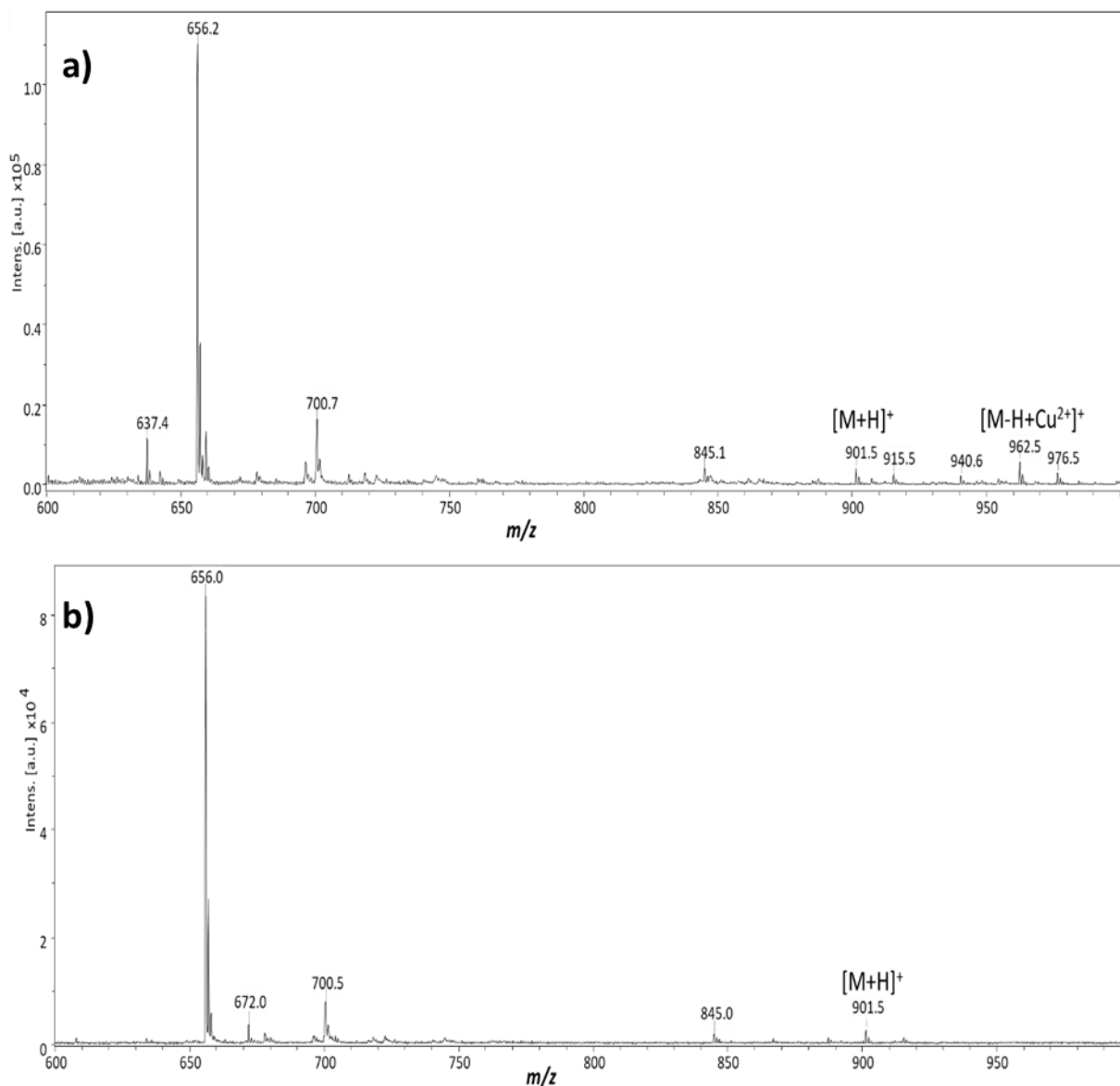


Figura 3.15. Espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, do isolado LaBioMMi 1141 (*Bacillus* sp.) cultivado em a) 0.08 mg/mL de Cu^{2+} e b) 0.04 mg/mL de Cu^{2+} .

A Figura 3.16 ilustra outras vias pelas quais os metais em solução podem ser trapeados e retirados da mesma. Nessa é observada a complexação do íon metálico com um metabolito sideroforo produzido pelo isolado LaBioMMi 1180. Quando dissociado em solventes não aquosos, como por exemplo do metanol, o cloreto férrico apresenta um modelo de solvatação dos íons por coordenação octaédrica dos íons Fe^{3+} com quatro ligações ferro-oxigênio e duas ligações cloro-ferro, de modo que a espécie observada é o $[\text{Fe}(\text{MeOH})_4\text{Cl}_2]^+$ ¹⁸⁷.

Como pode ser observado na Figura 3.16 quando em presença das moléculas de surfactina, há a troca dos íons Na^+ pelos íons Fe^{3+} solvatados pelo metanol, dessa forma observa-se o desaparecimento do íon 1058 Da e o surgimento

do íon 1089 Da. Portanto, além de ocorrer a retirada dos íons da solução através da biossorção do Fe^{3+} por meio da complexação com bacillibactina, também há a complexação com os metabólitos secundários sideróforos como a surfactina. De fato, tais metabólitos apresentam grande potencial biotecnológico na biorremediação de ambientes contaminados. Adicionalmente, a Figura 3.17 ilustra o complexo ferri-surfactina.

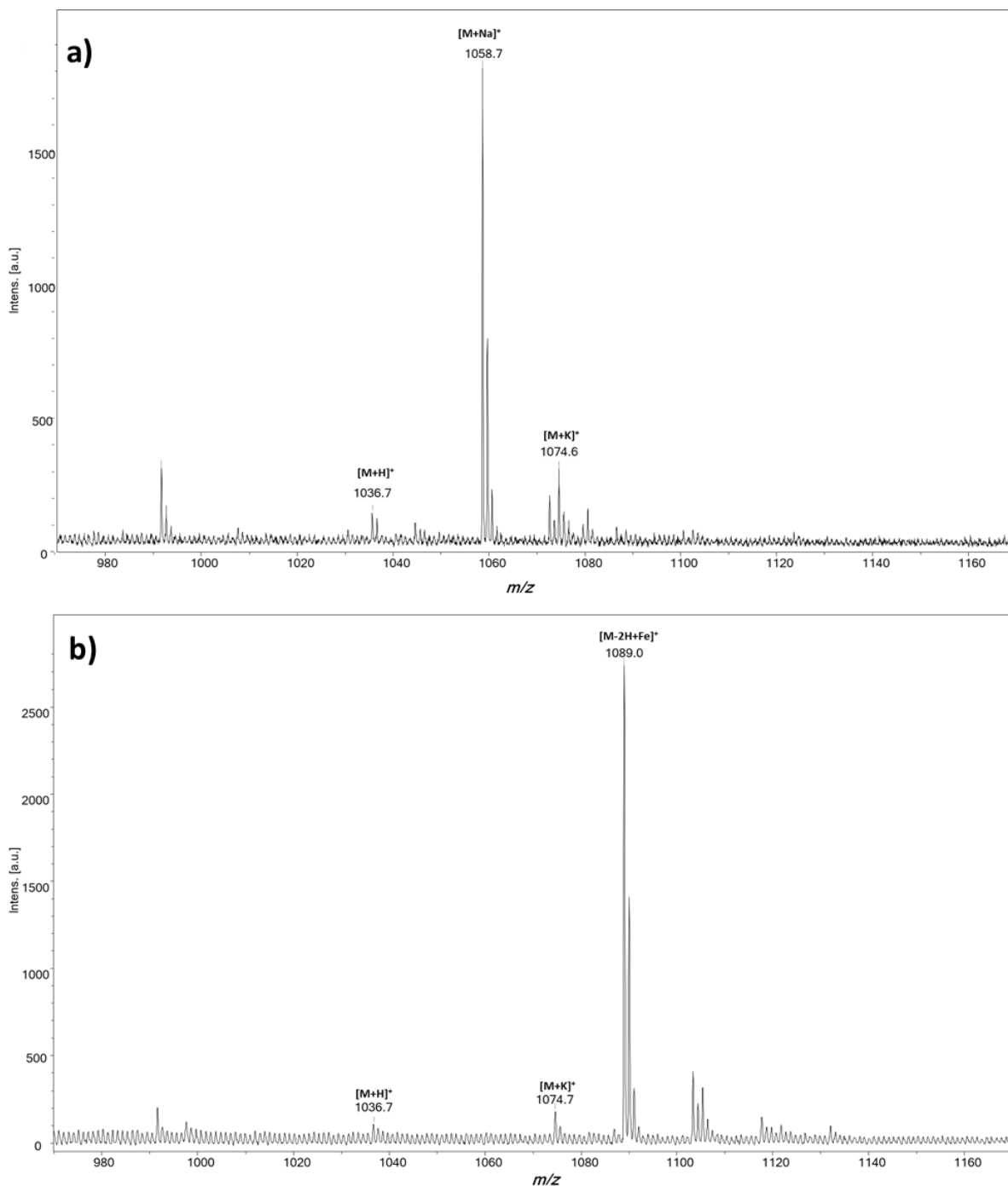


Figura 3.16. Formação do complexo siderofo-Fe(III) com o metabólito surfactina (C15) produzido pelo isolado LaBioMMi 1180: a) 20 $\mu\text{mol/L}$ de surfactina (C15) e b) 20 $\mu\text{mol/L}$ de surfactina + excesso de 200 vezes de Fe^{3+} .

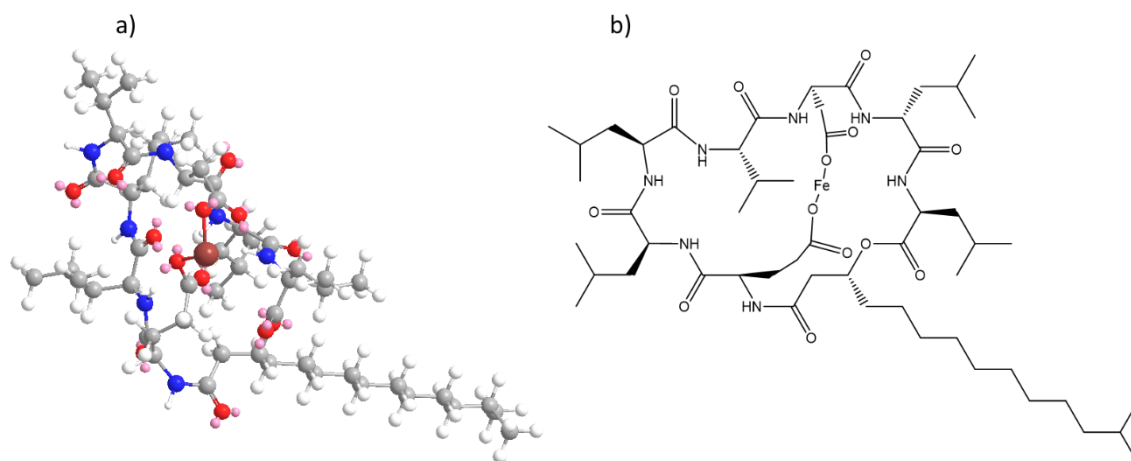


Figura 3.17. Representação do complexo ferri-surfactina.

Em 1999, Mulligan et al. mostraram o potencial da aplicação de surfactina na mitigação de solos e sedimentos contaminados com resíduos de óleo e metais pesados. A lavagem de amostras de solo, contendo 110 mg/Kg de Cobre e 3300 mg/Kg de Zinco, com solução de 0,25% de surfactina e 1% de NaOH demonstram a possibilidade de remoção de 25% do total de Cobre presente na amostra e 6% do total de Zinco. Ao se empregar lavagens sucessivas a quantidade de metal pesado aumento de 25% para 70% com relação a Cobre e 6% para 22% com o Zinco¹⁸⁸.

Em 2010, Guo et al.¹⁸⁹ estudaram a capacidade de biossorção de vários metais pesados por um *Bacillus sp.* endofítico de *Solanum nigrum L.*, uma herbácea com alto potencial na aplicação de biorremediação. Os efeitos da hormese da presença dos metais pesados divalentes (Cu (II), Cd (II) e Pb (II)) foram observados sob concentração relativamente baixa (10 mg/L). Como efeito produzido pela presença dos metais foi observado o aumento anormal das atividades da ATPase, além de ser observado, 24 horas de incubação, o a absorção de 75,8%, 80,5%, 21,3% de Cd (II), Pb (II) e Cu (II), respectivamente, da concentração inicial de 10 mg/mL. Contudo, não foi observado resultados significantes para biossorção de cromo. Concluiu-se que o endófito possui excelente capacidade de adaptação e promissora eficiência na remediação na biorremediação de metais pesados em baixas concentrações, de forma que o mesmo poderia ser útil para o desenvolvimento de sistemas eficientes de remoção desses metais.

O efeito sinérgico da associação de várias cepas bacterianas na biorremediação de solos contaminados com os metais pesados Pb, Cd e Cu de solos foi avaliada por Kang¹⁹⁰. O efeito sinérgico da associação das cepas *Viridibacillus arenosi* B-21, *Sporosarcina soli* B-22, *Enterobacter cloacae* KJ-46 e *Enterobacter cloacae* KJ-47 foi avaliado comparativamente a culturas de uma única cepa. Como resultado pode-se observar que quando cultivadas em conjunto houve maior taxa de crescimento, atividade de urase, resistência a metais pesados e também efeito sinérgico remediação de vários metais pesados. Após 48h incubação foi observada a remediação de 98,3% para Pb, 85,4% para Cd e 5,6% para Cu.

O processo de remoção dos metais pesados do solo ocorre através da adsorção dos monômeros e das micelas de surfactina na interface do solo, e a consequente formação de complexos com metais. Posteriormente, os complexos de metal-surfactina são desorvidos da superfície do solo, devido a tensão interfacial entre o solo e a água, sendo então incorporados as micelas. Embora a aplicação de biosurfactantes quelantes em processos de biorremediação torne o processo ecologicamente correto, os mesmos apresentam desvantagens frente a quelantes sintéticos, como diminuição da eficiência em termos de rendimento de remoção, maior tempo e quantidade nos procedimentos de tratamento, uma vez que os complexos formados são menos estáveis quando comparado com os dos quelantes sintéticos¹⁹¹.

4.2 Experimento de biodegradação de polímeros utilizando o isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*)

4.2.1 Análise gravimétrica dos resíduos biodegradados

Nos experimentos de aplicação dos microrganismos endofíticos associados a *Podocarpus macrophyllus* foi avaliada a capacidade do isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*) na biodegradação de polímero, quando esses são adicionados ao meio de cultura como a única fonte de carbono. A Tabela 3.11 demonstra os resultados segundo os valores da massa inicial adicionada e final de polímero, redução média em massa, a porcentagem média de redução de massa e o desvio padrão de cada experimento. Em todos os casos avaliados foi possível a verificar uma ligeira redução da massa inicial adicionada.

Tabela 3.11. Percentual de redução da massa do polímero durante o processo de biodegradação pelo isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*).

	Massa média inicial (g)	Massa média final (g)	Redução média (g)	Desvio padrão	% média de redução
PEAD	1,0573	1,0330	0,0243	0,0027	2,30
PP	1,0473	1,0183	0,0290	0,0256	2,77
PA11	1,0805	1,0389	0,0416	0,0070	3,85
PET	1,0327	1,0065	0,0175	0,0160	1,69
OS	1,3057	0,9567	0,0790	0,0417	7,63

A Figura 3.18 demonstra a variação das médias, com os desvios padrões de cada uma, das massas dos polímeros avaliados no teste de biodegradação, sendo C1 a C4 relativo ao grupo controle e C5 a C8 para o grupo de amostras biodegradadas. Ao se avaliar os pares de média inicial e final, ou seja (C1 e C5; C2 e C6; C3 e C7; C4 e C8), é possível verificar que os desvio dos 3 primeiros pares acabam por sobrepor as massas inicial e final, sendo que, apenas o par C4 e C8 que apresenta médias realmente diferentes entre si. Esse fato é comprovado ao se efetuar o teste ANOVA para os experimentos individuais, no qual é possível verificar que apenas o par C4 e C8 possui valor de p inferior a 0,05. Nas condições realizadas os experimentos relativos aos pares: C1 e C5; C2 e C6; C3 e C7; não possuem validade estatística, o desvio padrão calculado para esses experimentos está relativamente alto e seriam necessárias mais replicadas para verificar a validade da redução dessas massas.

Os valores de perda de massa em processos de biodegradação, relatados na literatura, para diversos tipos de polímero são bem dispares. Os resultados de Sudhakar et al.¹⁹² obtidos em 2008 estão de acordo com os observados para os experimentos realizados nesse trabalho. Os autores estudaram a biodegradação de polietileno, de alta e baixa densidade como única fonte de carbono, por *Bacillus* sp. onde observaram perda de massa inferior a 3% para as amostras de PEBD e PEAD, para até 6 meses de cultivo, nos experimentos sem pré tratamento. Diferentemente ao supracitado, Balasubramanian et al.¹⁹³ obtiveram redução de massa do PEAD de 12% para *Arthrobacter* sp. e 15% para *Pseudomonas* sp. após 3

meses de processo de biodegradação. Entretanto, as condições de cultivo foram diferentes das utilizadas nesse trabalho e no realizado por Sudhakar et al., foi utilizado meio sintético para o cultivo das bactérias e o PEAD utilizado foi previamente degradado por outros processos, que não forma descrito no trabalho. Yang et al. em 2010 avaliaram a capacidade das bactérias endolíticas de traças na biodegradação de PEBD. Os dois isolados identificados foram a *Enterobacter asburiae* e *Bacillus* sp., ambas apresentaram a capacidade de biodegradar o polímero, sendo que as perdas de massa foram de aproximadamente 6% e 11%, respectivamente, para no período de 60 dias de experimento¹⁹⁴.

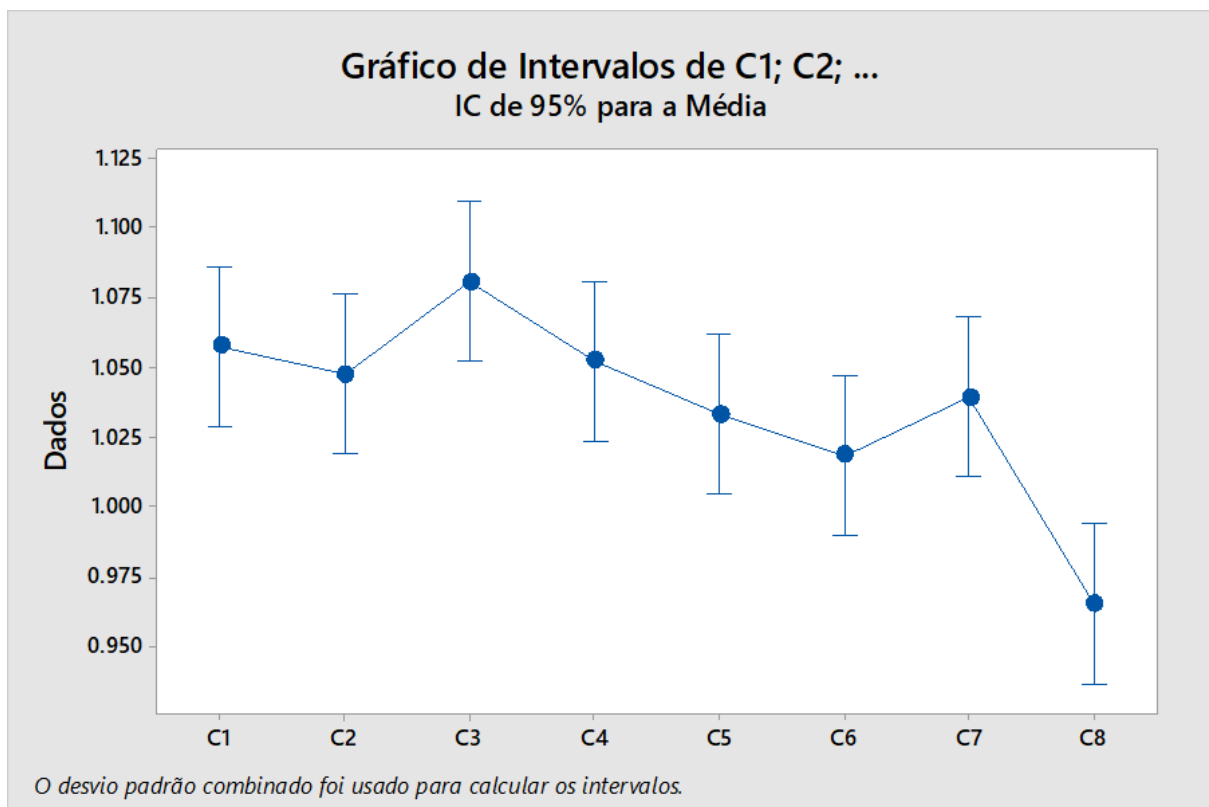


Figura 3.18 Oscilação da média das massas dos polímeros durante o processo de biodegradação pelo isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*).

Em 2017, Syranidou et al.¹⁹⁵ estudaram o processo de biodegradação de filmes de poliestireno, pré degradados por envelhecimento ambiental, por comunidades isoladas de microrganismos marinhos e comunidades enriquecidas com alguns microrganismos. Ambas comunidades foram capazes de biodegradar os filmes poliméricos, sendo que a média de perde de massa observada para as comunidades isoladas foi de 2% e para as comunidades enriquecidas foi de 4%. Jun et al.¹⁹⁶ e Müller et al.¹⁹⁷ avaliaram lipases isoladas de *Pseudomonas* spp. no processo de

despolimerização de PET, em ambas os casos as lipases não forma efetivas na biodegradação do polímero. Entretanto, em 2009, Ronkvist et al.¹⁹⁸ avaliou a capacidade de biodegradação cutinases isoladas de *Pseudomonas mendocina* e *Fusarium solani* em amostras de PET com baixa cristalinidade. Os experimentos com ambas as enzimas apresentaram redução de aproximadamente 5% com 96 horas de incubação.

4.2.2 Análise dos extratos do meio de cultura do experimento de biodegradação por MALDI TOF/TOF MS

A Figura 3.19 ilustra o resultado ao se adquirir o espectro de MALDI TOF-MS do extrato do experimento de biodegradação do polietileno de alta densidade (PEAD). Nesse espectro é possível se observado sinais homólogos distante entre si em 74 Da, os quais não são condizentes com a diferença de massa dos monômeros de etileno, que possuem massa de 28 Da. Em 1993, Vasile et al.¹⁹⁹ propôs uma rota pela qual microrganismos poderiam metabolizar as cadeias poliméricas obtendo energia através da degradação do polímero. A rota inicia-se tanto por ação abióticas quanto por biótica. Na ação abiótica ocorre a fotooxidação das cadeias poliméricas até formação de carboxilas, as quais aumentam a susceptibilidade da ação de microrganismos pela via do metabolismo de ácidos graxos através da rota da β -oxidação. A biodegradação o mecanismo pode ocorrer pelas rotas anaeróbica ou aeróbica, essa por sua vez é dependente da rota ω -oxidação e da β -oxidação.

Pela rota aeróbica o processo de biodegradação inicia-se pela oxidação das longas cadeias de carbono, para formação de álcool primários e secundários, sendo que os álcoois primários são formados por enzimas da classe de citocromo P450, em bactérias e leveduras, citocromo P153 em bactérias e em casos particulares por atuação da alceno hidroxilases. Em seguida, o álcool primário é oxidado á ácido carboxílico pela atuação das enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase. Em seguida a formação do tio éster entre o ácido carboxílico previamente formado com a coenzima A por meio da atuação da acetil-CoA sintase. Já os álcoois secundários são formados pela subterminal alceno monooxigenase e são oxidados a cetona pela enzima álcool desidrogenase. Por meio de uma reação de Bayer-Villiger catalisada pela Bayer-Villiger monooxigenase a cetona previamente formada é

convertida a um éster. A rota iniciada pela biossíntese do álcool secundário se conecta a rota da ω -oxidação pela hidrólise do éster a um álcool primário e um ácido carboxílico por meio da catalise de uma esterase^{200,201}.

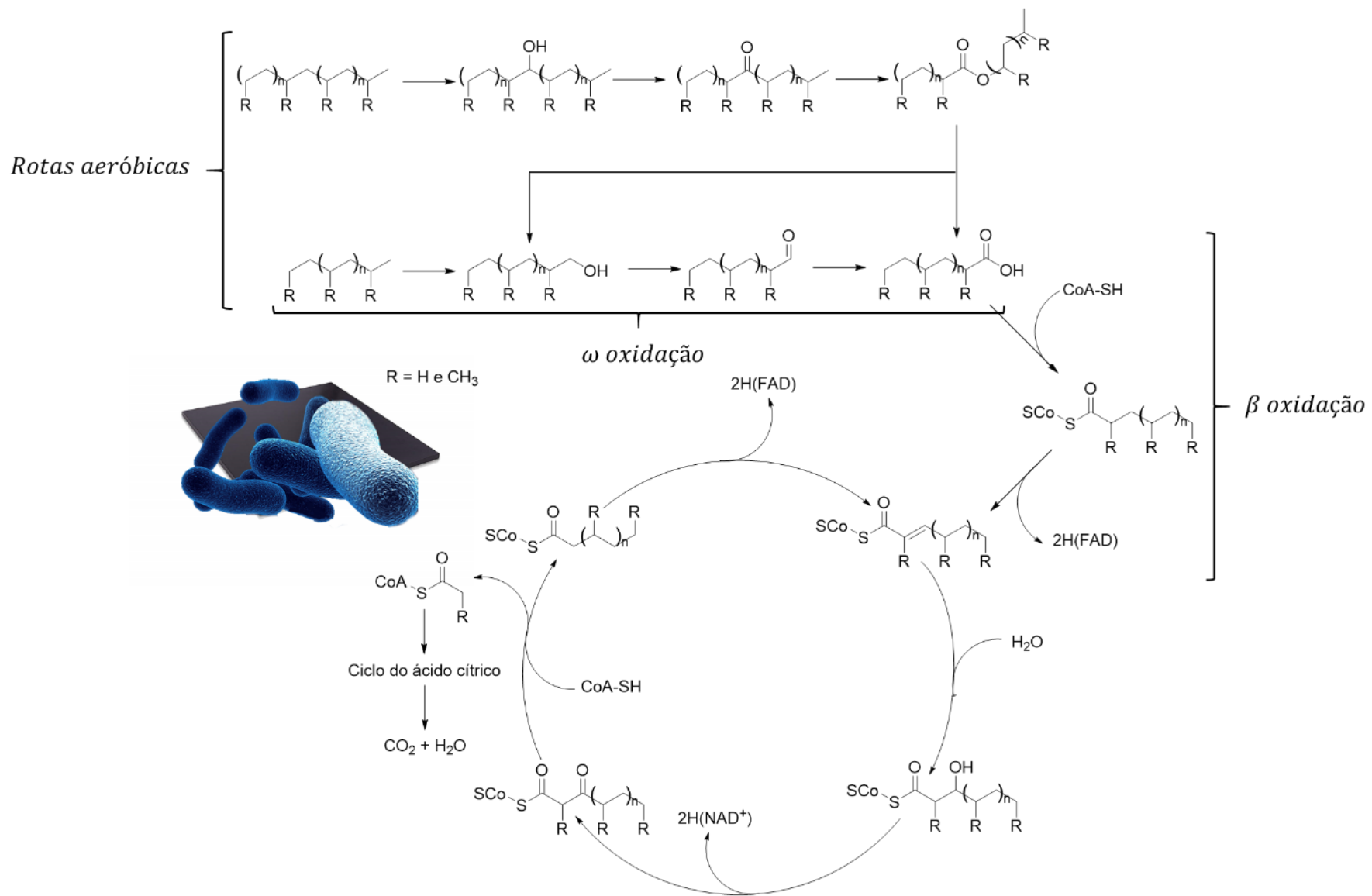


Figura 3.19 Mecanismo de biodegradação de cadeia polimérica adaptado de Vasile et al.¹⁹⁹.

A oxidação de ácidos graxos é um fenômeno generalizado na natureza. Entretanto, o processo *in vivo* conhecido como ω -oxidação, no qual ocorre a hidroxilação do carbono alquílico terminal, carbono mais distante do grupo carboxila do ácido graxo, a um álcool e, posteriormente, a um ácido dicarboxílico foi proposto primeiramente que ocorresse apenas em fungos, plantas superiores e animais. O processo ω -oxidação é catalisado por uma enzima hemoproteína do citocromo P450 e atualmente grande quantidade de citocromo P450s com função de hidroxilação de ácidos graxos tem sido relatada em humanos, plantas e também em procariotos^{201,202}.

Em 2011, Scheps et al.²⁰³ avaliaram a eficiência de hidroxilases da subfamília CYP153A de citocromo P450 na biotransformação utilizando como substrato n-alcenos de C₅ a C₁₂ e álcoois primários de C₆ a C₁₂. As enzimas CYP153A de *Mycobacterium marinum* (CYP153A16) e *Polaromonas* sp. (CYP153AP.sp.) foram clonadas e expressas em *E. coli*, ambas as enzimas produziram álcoois primários e α , ω -alcanodióis, sendo que para CYP153AP.sp. observou-se predominantemente ω -hidroxilação, enquanto a CYP153A16 apresentou a capacidade de catalisar tanto as reações de ω -hidroxilação quanto a de α , ω -dihidroxilação.

Em 2013, Scheps et al.²⁰⁴ construíram uma enzima otimizada na ω -oxidação de ácidos graxos. A co-expressão da monooxigenase CYP153A da *Marinobacter aquaeloei* juntamente com o domínio da redutase P450 BM3 do *Bacillus megaterium* garantiram uma ótima expressão da proteína quando ambos os genes foram expressos em uma *E. coli* recombinante. A combinação dos genes de ambas bactérias apresentou ótimos resultados no processo de ω -oxidação, sendo até três vezes mais eficiente que outros sistemas redox utilizados e apresentando ótima regioseletividade na hidroxilação do ácido dodecanóico e também do seu metil ester.

Craft et al.²⁰⁵ detectaram a produção de ácidos α , ω -dicarboxílicos pela cepa de *Candida tropicalis* ATCC 20336 quando a mesma era cultivada em meio de cultura cuja fonte de carbono era constituída de n-alcenos ou ácidos graxos. O complexo responsável pela conversão dos n-alcenos e ácidos graxos em ácidos α , ω -dicarboxílicos é constituído pela monooxigenase do citocromo P450 (CYP) e a citocromo P450 redutase (NCP) que compõem a hidroxilase responsável pela primeira etapa do processo de oxidação. Também é a etapa limitante da velocidade da co-oxidação dos n-alcenos e dos ácidos graxos.

Ao todo 10 membros da família de genes P450 (CYP52) de *C. tropicalis* ATCC20336, bem como os genes relativos ao citocromo P450 redutase (NCP), foram sequenciados e clonados. Dos 10 genes avaliados, os genes CYP52A13 e CYP52A14 foram os que apresentaram maior indução de mRNA, conforme determinado por PCR durante os experimentos de fermentação utilizando o ácido graxo oleico, no qual foi observado um aumento de 27 vezes da formação de α , ω -dicarboxílicos, já com octadecano o aumento observado foi de 32 vezes. Além dos pares de genes CYP52A13 e CYP52A14, também foi observada a indução dos pares CYP52A17, CYP52A18 e CYP52A12. Tais resultados demonstram capacidade de produção de ácidos α , ω -dicarboxílicos por *C. tropicalis*.

A Figura 3.20 ilustra o espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, do extrato obtido a partir do particionamento do meio líquido do experimento de biodegradação do PEAD. No espectro é possível se visualizar duas séries homólogas de sinais distantes entre si em 74 Da, sendo que a primeira e segunda séries estão deslocadas em 15 Da. Baseado no mecanismo proposto na Figura 3.19 os sinais seriam provenientes de um oligômero de etileno ligado a coenzima A em uma das extremidades. A fórmula do oligômero pode ser estimada a partir do número de monômeros presentes na molécula. Tomando como exemplo o íon cuja massa é 1134, para estimar a fórmula molecular, pode-se observar a massa da molécula neutra e por regra a mesma possui número ímpar de nitrogênio que está de acordo com o número de átomos de nitrogênio presentes na molécula da coenzima A. Partindo desse pressuposto, o número de monômeros pode ser estimado pela diferença da massa da molécula desprotonada e do somatório da massa da coenzima A, ligada à carbonila do oligômero de etileno, com a da porção terminal do oligômero, que para o caso do PEAD seria uma metila. Por fim, essa diferença é dividida pela massa do monômero de etileno para se obter a estimativa do número de monômeros²⁰⁶. Para o íon 1134 Da que foi tomado como exemplo, o número de monômeros seria aproximadamente:

$$N = \frac{1133 - (766 + 28 + 15)}{28} \cong 11$$

Portanto, ao se considerar a cabeça e a cauda do oligômero, o número total de monômeros de etileno seria igual a 12. Ao se realizar o cálculo inverso se

obtem a massa de 1117, que difere da massa da molécula em 16 Da. Portanto, por estimativa a fórmula da molécula cuja massa é 1133 Da seria $C_{45}H_{82}N_7O_{18}P_3S$.

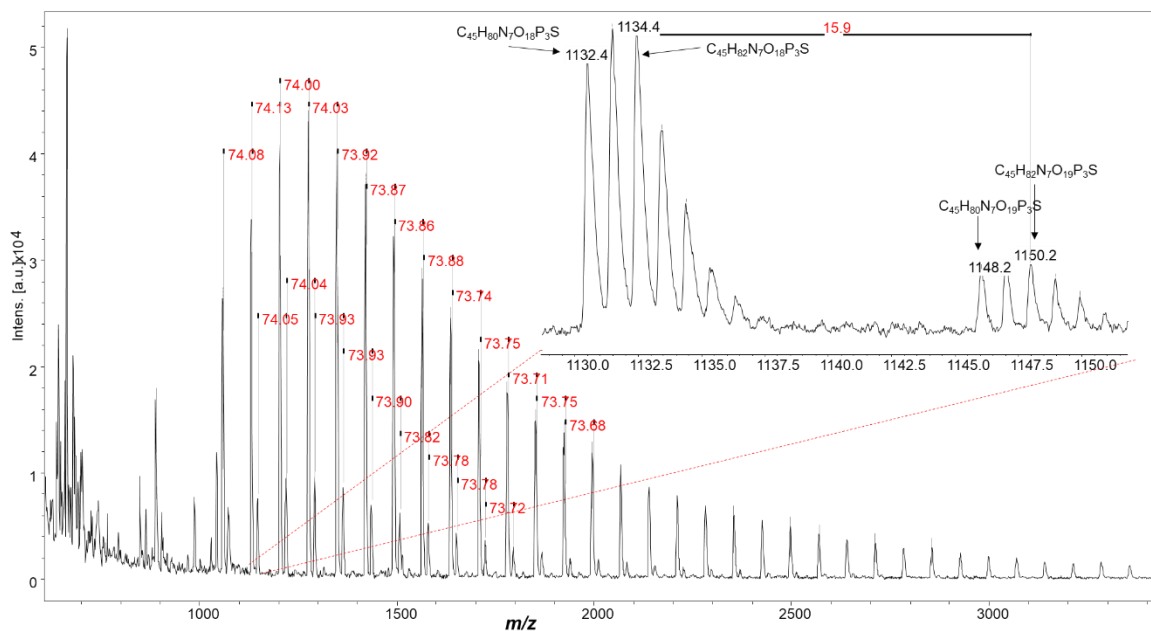


Figura 3.20. Espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, para o extrato do cultivo do isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*) com PEAD como fonte de carbono.

Ainda baseado no mecanismo da Figura 3.19 a molécula, cujo íon corresponde a 1132 Da, é relativa ao oligômero com uma ligação dupla no carbono alfa a carbonila ligada a coenzima A, e por estimativa a fórmula da mesma seria $C_{45}H_{80}N_7O_{18}P_3S$. Além disso, pode-se concluir que a série homologa defasada em 16 Da é relativa aos oligômeros com uma hidroxila e com uma carbolina a mais, ambos na posição beta em relação a carbolina ligada a coenzima A, de tal forma que as fórmulas das moléculas cujos íons correspondentes são 1150 e 1148 seriam $C_{45}H_{82}N_7O_{19}P_3S$ e $C_{45}H_{80}N_7O_{19}P_3S$ respectivamente. Adicionalmente, a sobreposição dos padrões isotópicos dos íons 1133 e 1134 Da, e 1148 e 1150 Da, seriam responsáveis pelo padrão do sinal observado no espectro de MALDI TOF-MS. Tendo em vista que os experimentos de fragmentação dos oligômeros, obtidos como produto de biodegradação dos polímeros, não foram bem sucedidos vale a pena ressaltar que as fórmulas dos oligômeros são apenas estimativas, pois experimentos adicionais seriam necessários para confirmar as fórmulas e estruturas dessas moléculas.

Na Figura 3.18 é possível observar que uma unidade monomérica é retirada ao final do ciclo que leva ao consumo da cadeia do oligômero por meio da

rota do ácido cítrico. Entretanto, observa-se nas Figura 3.20 e Figura 3.21 que o sinais das series homologas estão distantes entre si em 74 Da, os quais não correspondem aos monômeros de etileno, propileno e estireno. Logo, essas moléculas são oriundas de um processo de biodegradação conjunto entre os dois mecanismos aeróbicos, tendo em vista que a degradação exclusiva pela rota da ω -oxidação levaria a oligômeros, oriundos do processo de biodegradação, com número par de monômeros.

O mesmo raciocínio pode ser empregado anteriormente também pode ser utilizado para os resultados ilustrados na Figura 3.21 que são relativos a aquisição do espectro de MALDI TOF-MS do extrato obtido a partir do particionamento do meio líquido do experimento de biodegradação do PP. Utilizando novamente o íon 1134 Da como exemplo, formula desse oligômero pode ser estimada pela diferença da massa da molécula desprotonada e do somatório da massa da coenzima A, ligada à carbonila do oligômero de propileno, com a da porção terminal do oligômero, que para o caso do PP também seria uma metila, dividido pela massa do monômero de propileno. Sendo assim, temos que o número de monômeros é:

$$N = \frac{1133 - (766 + 28 + 15)}{42} \cong 7$$

Portanto, o número de monômeros de propileno é igual a 7 e assim a fórmula da molécula, cujo íon é 1134 Da, seria novamente $C_{45}H_{82}N_7O_{18}P_3S$, e a fórmula do oligômero com uma ligação dupla no carbono alfa a carbonila ligada a coenzima A, 1132 Da, seria $C_{45}H_{80}N_7O_{18}P_3S$.

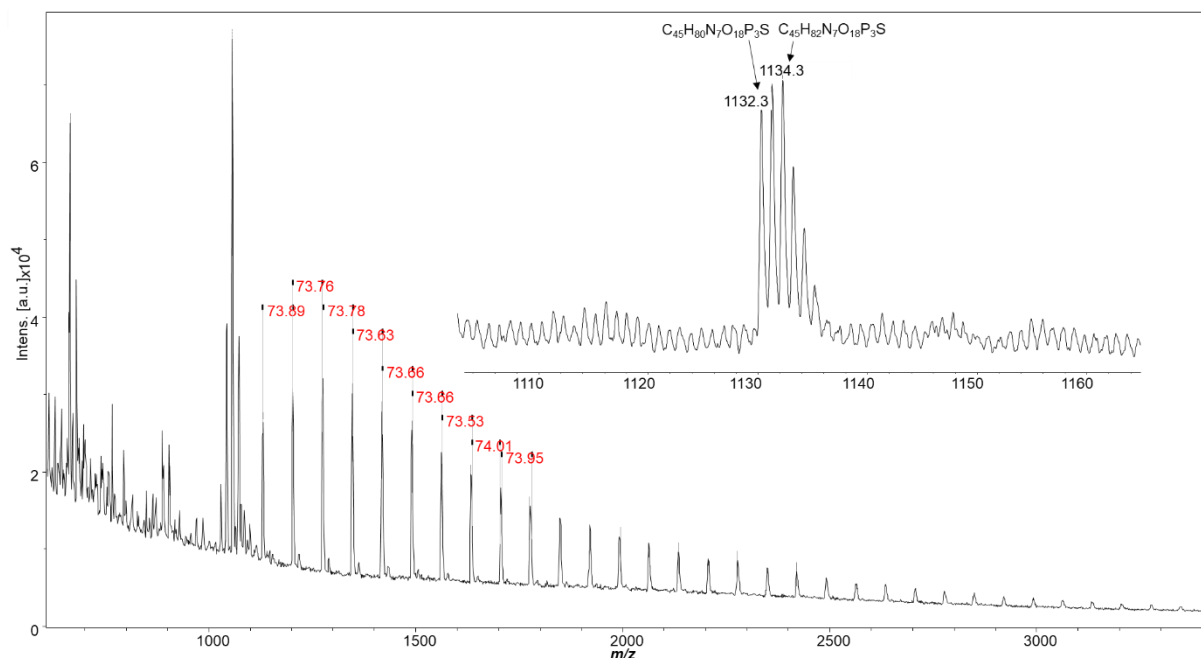


Figura 3.21 Espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, para o extrato do cultivo do isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*) com PP como fonte de carbono.

A Figura 3.22 demonstra o espectro de MALDI TOF-MS do extrato obtido a partir do particionamento do meio líquido do experimento de biodegradação do PS. Embora esse polímeros também apresente a mesma serie homologa de sinais variando em 74 Da, o mecanismos de biodegradação aplicado para o PEAD e PP parece não ser adequado para a explicação do processo de biodegradação do poliestireno.

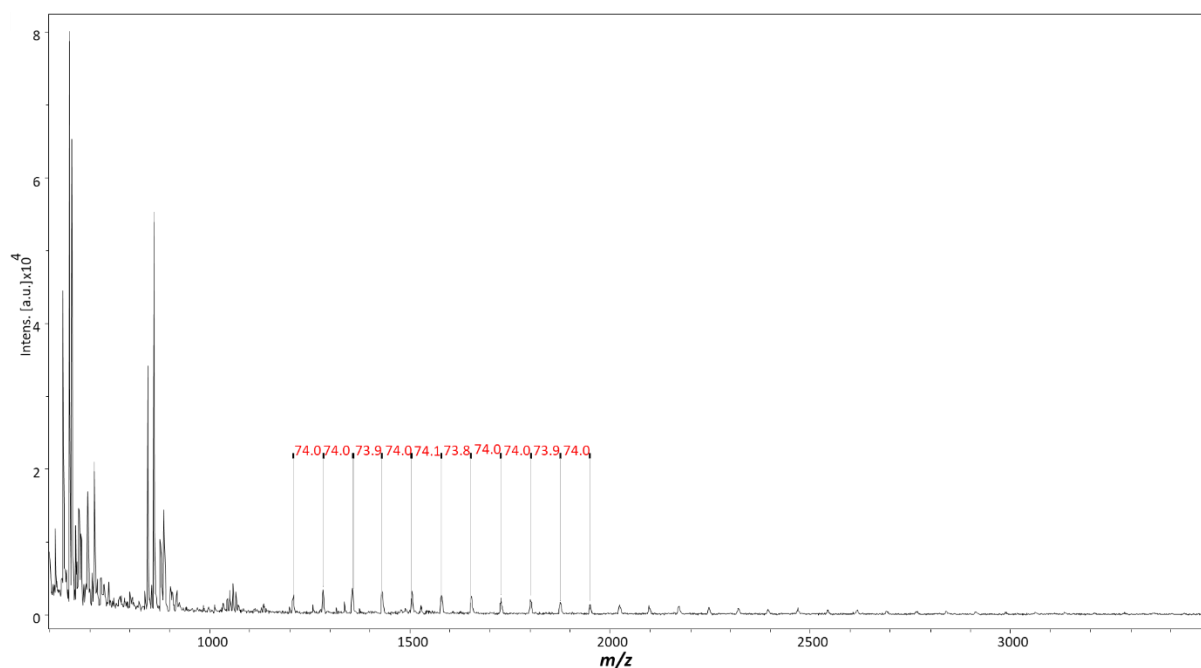


Figura 3.22. Espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, para o extrato do cultivo do isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*) com PS como fonte de carbono.

As Figura 3.23 e Figura 3.24 correspondem os espectros de MALDI TOF-MS dos extratos obtidos a partir do particionamento dos meios líquidos dos experimentos de biodegradação do PA-11 e PET. Embora esses polímeros sigam mecanismos de biodegradação distintos do aplicado para o PEAD e PP, esperava-se identificar de padrões relativos ao processo de biodegradação. Entretanto, não foi observado nenhum padrão condizente com a presença de oligômeros, como nos experimentos anteriores, tanto para PA-11 quanto para PET.

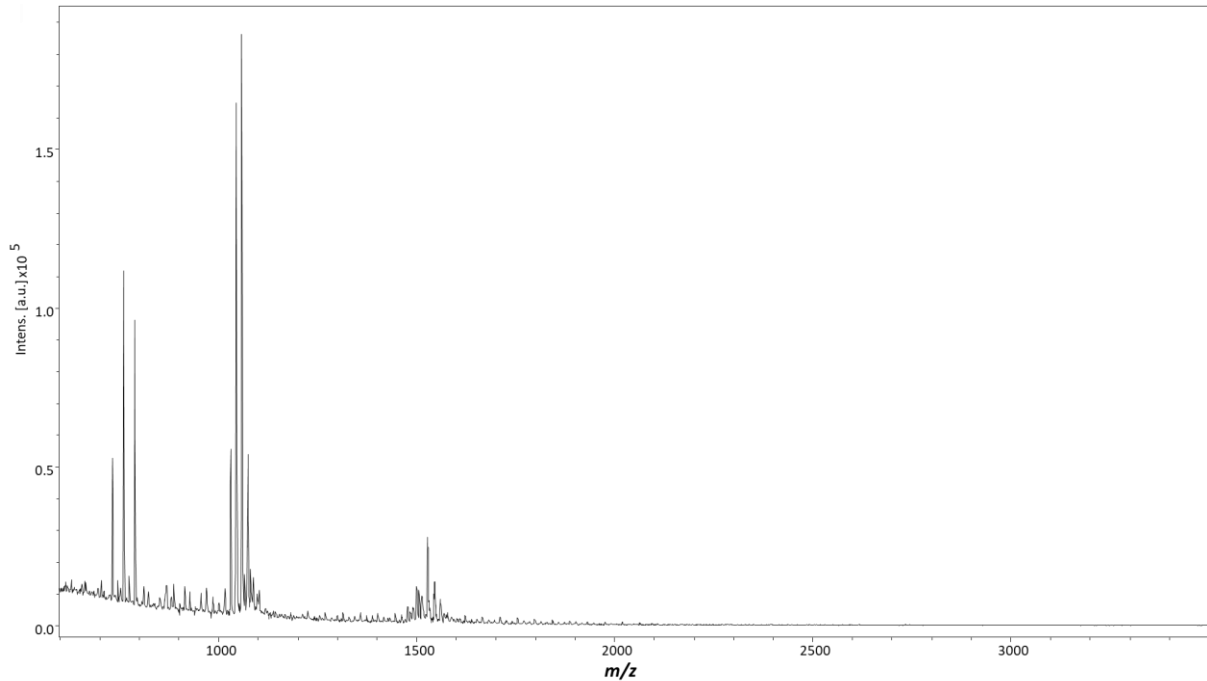


Figura 3.23. Espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, para o extrato do cultivo do LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*) com PA-11 como fonte de carbono.

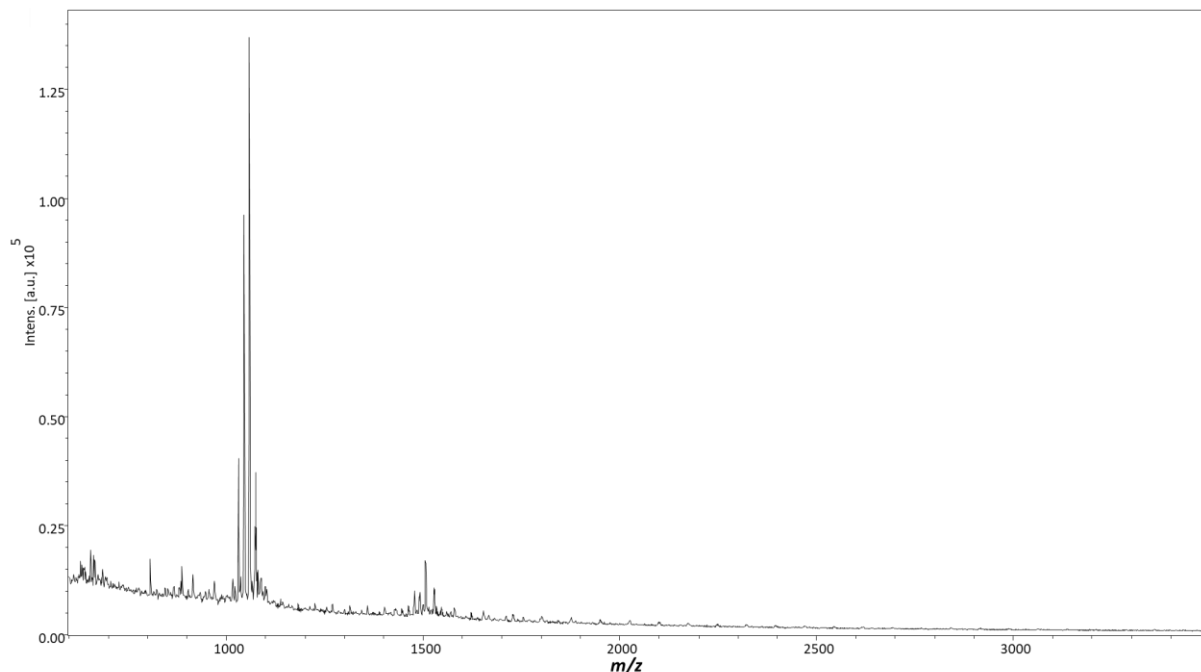


Figura 3.24. Espectro de MALDI TOF-MS, adquirido no modo positivo de aquisição de íons, para o extrato do cultivo do LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*) com PET como fonte de carbono.

4.2.3 Caracterização das amostras controle de biodegradadas dos polímeros utilizados nos experimentos de biodegradação.

As Figura 3.25 a 3.29 ilustram os espectros de infravermelho, de 4000 a 600 cm^{-1} , para as amostras controle da biodegradação dos polímeros. Segundo a rota proposta por Vasile et. al em 1993¹⁹⁹, eram esperadas alterações específicas no espectro de PEAD, PP e PS através do surgimento das bandas de OH na região de 3600-2500 cm^{-1} e na região de 1760-1700 cm^{-1} das carbonilas dos aldeídos e carboxilas dos ácidos formados. Para os experimentos com PP e PS não foram observadas alterações que corroborassem o mecanismo de biodegradação dos materiais, e para PA-11 não foram observadas alterações significativas nos espectros.

Entretanto, na Figura 3.25 observam-se alterações nas intensidades das bandas das amostras biodegradadas pelo período de 60 dias. Vale destacar as alterações das bandas em 720 e 730 cm^{-1} que são relacionadas a fase cristalina e amorfa respectivamente. Pode-se calcular que a relação de 730/720 aumenta de 1,12 na amostra controle para 1,29 após o período de biodegradação de 60 dias e tal fato evidencia o aumento da cristalinidade da amostra.

Na Figura 3.29 também são observadas alterações significativas nas intensidades de uma série de bandas características do PET. Destaca-se em especial a alteração sofrida na intensidade da banda relativa a carboxila de éster, que evidencia o processo de despolimerização da amostra.

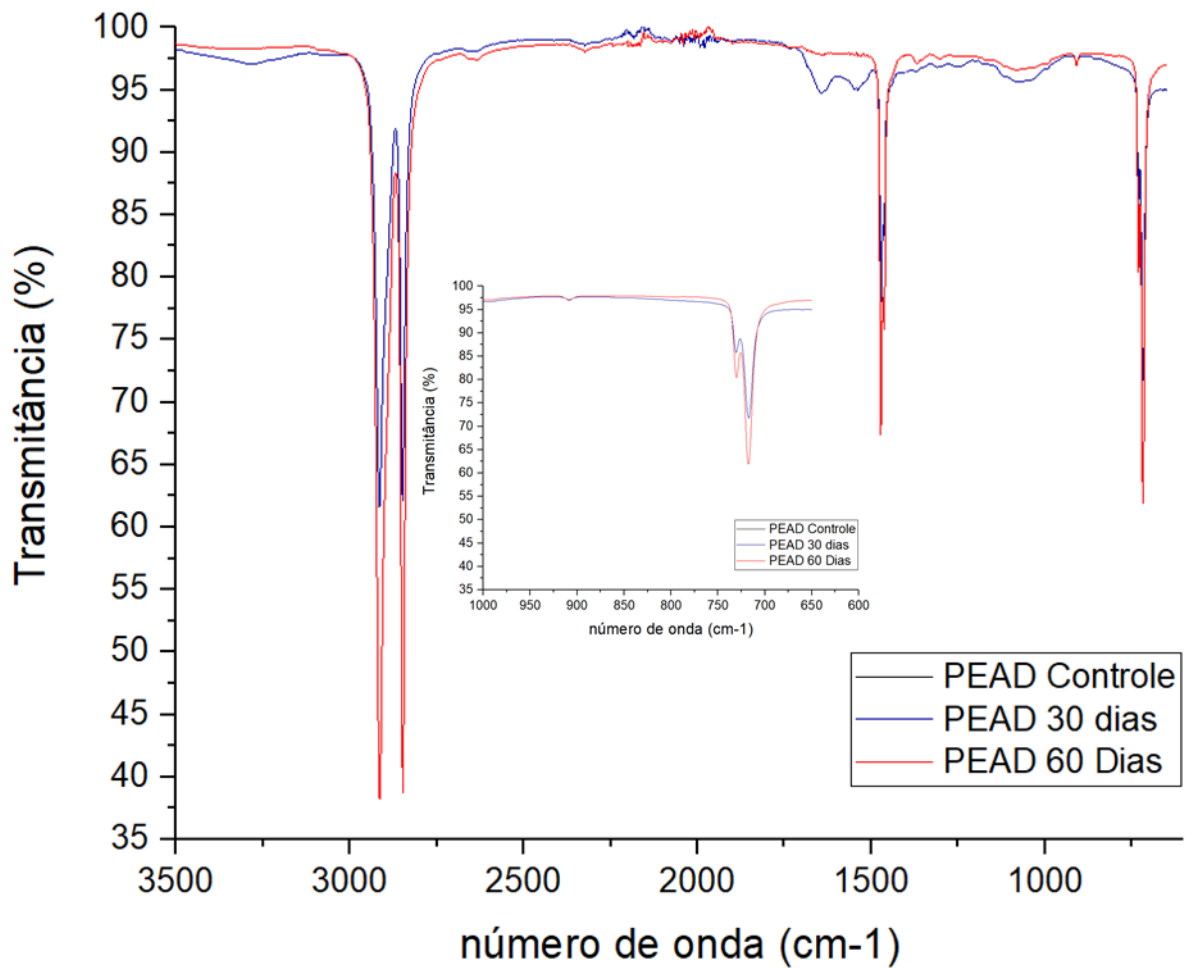


Figura 3.25. Espectro de infravermelho das amostras de PEAD, controle e biodegradadas, obtidas nos experimentos com o isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*).

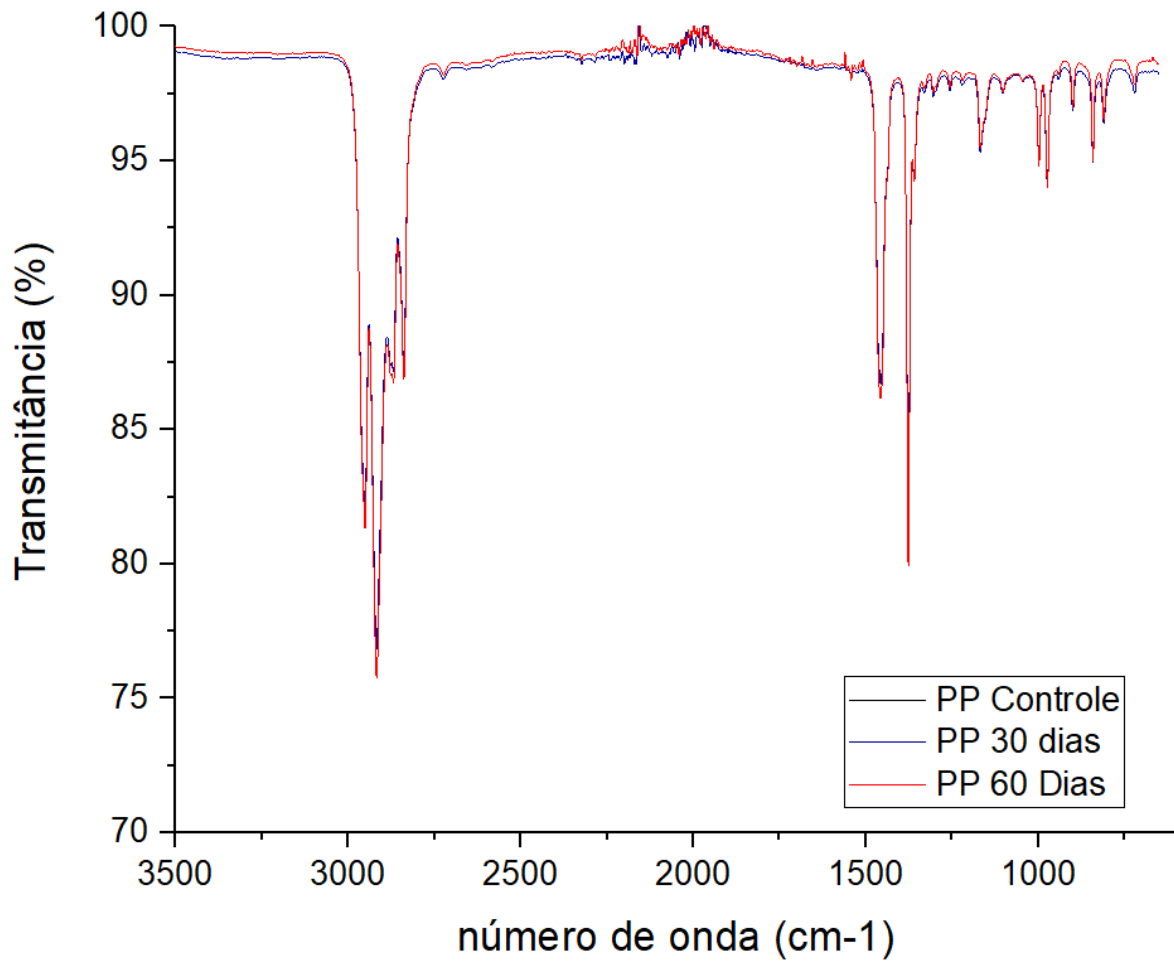


Figura 3.26. Espectro de infravermelho das amostras de PP, controle e biodegradadas, obtidas nos experimentos com o isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*).

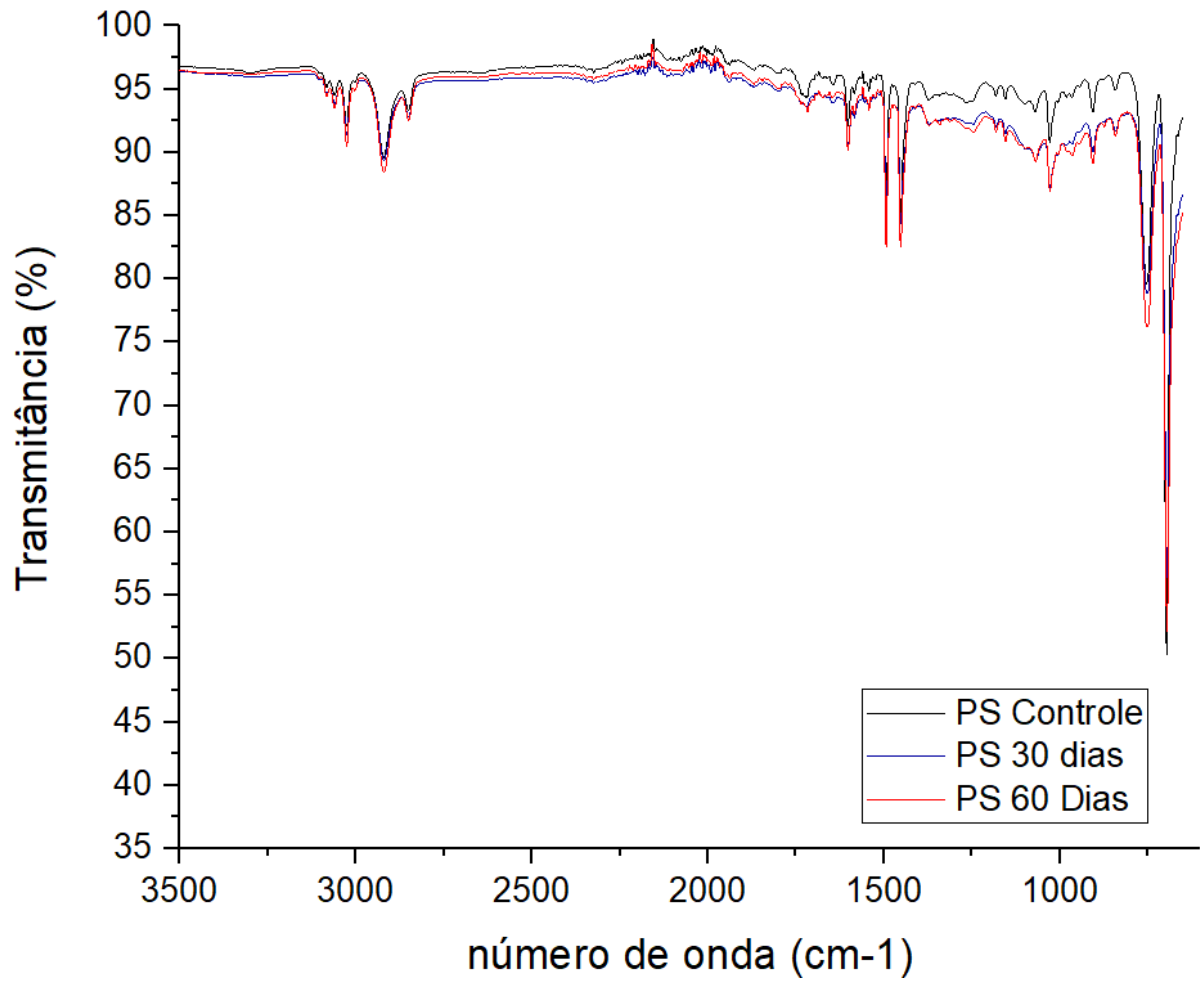


Figura 3.27. Espectro de infravermelho das amostras de PS, controle e biodegradadas, obtidas nos experimentos com o isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*).

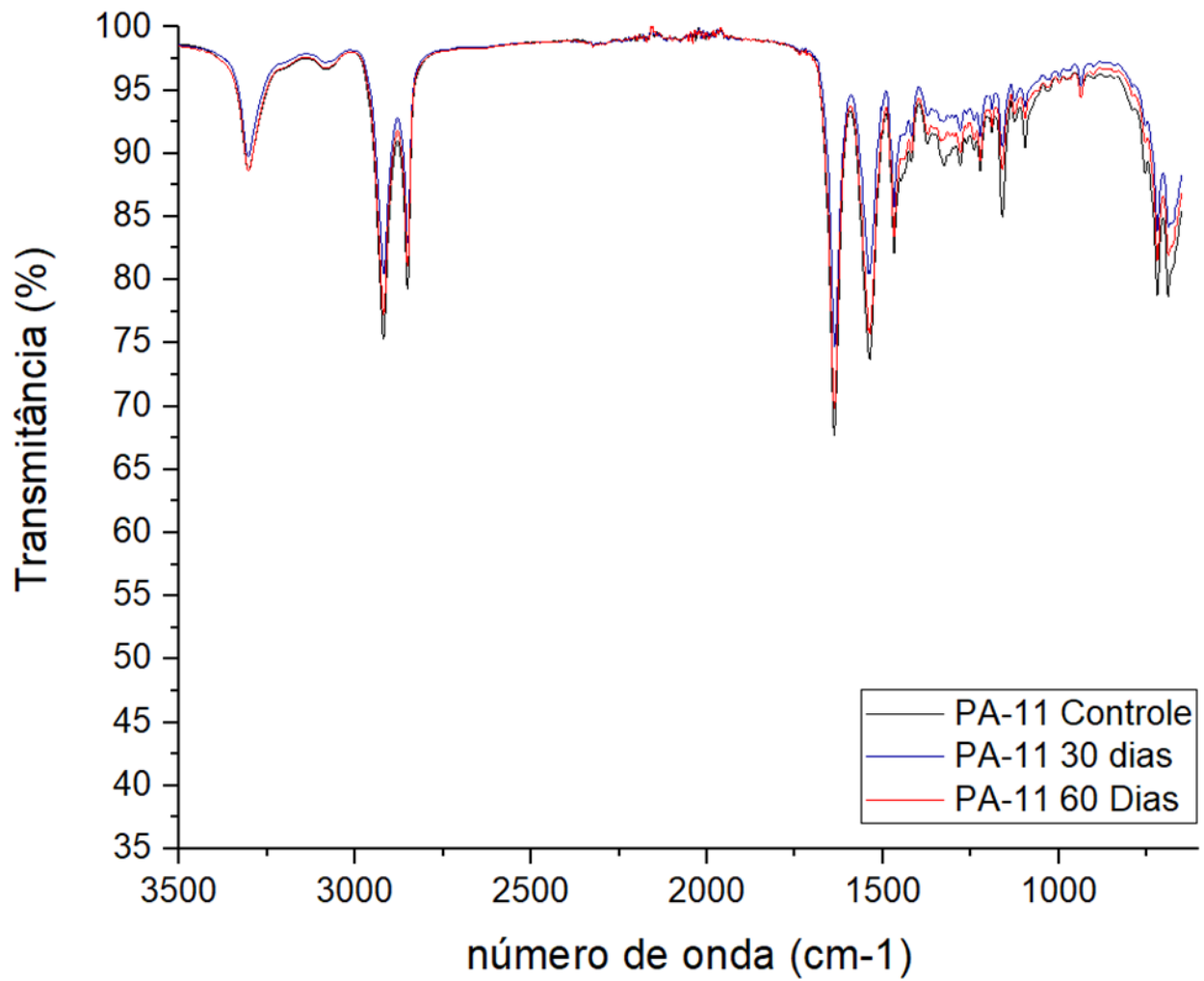


Figura 3.28 Espectro de infravermelho das amostras de PA-11, controle e biodegradadas, obtidas nos experimentos com o isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*).

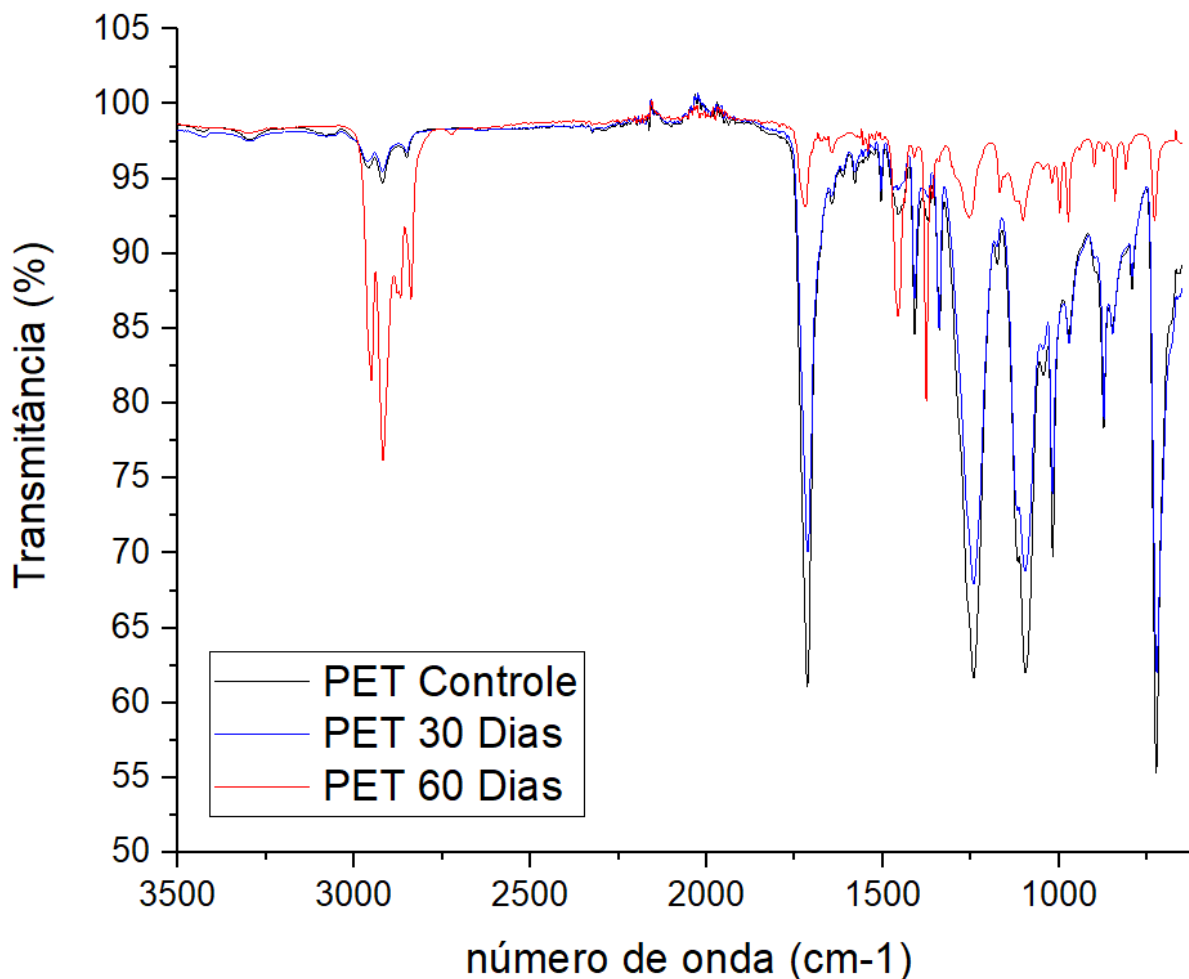


Figura 3.29 Espectro de infravermelho das amostras de PET, controle e biodegradadas, obtidas nos experimentos com o isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*).

Diversos resultados referentes do processo de biodegração de polímeros podem ser encontrados na literatura. Contudo, os resultados obtidos para a biodegradação de poliolefinas descrevem alterações no perfil dos espectros relacionados a processos oxidativos ao invés de alterações nas propriedades físico-químicas como observado nesse trabalho. Durante o processo biodegradação de PEBD e PEAD, Sudhakar et al.¹⁹² observaram o surgimento e aumento de intensidade de bandas em 1715, 1740, 1640 e 915 cm⁻¹, relativas à formação de ácidos, cetonas e duplas ligações respectivamente, nos primeiros meses do processo de biodegradação. Após 6 meses foi observada a redução dessas bandas devido à alteração do mecanismo de biodegradação.

De modo similar, Balasubramanian et al.¹⁹³ também observaram a modificação do espectro de IR através do surgimento das bandas de ácido, cetona e ligações duplas. A alteração observada nas intensidades das bandas foi dependente da espécie de bactéria utilizada nos experimentos de biodegradação.

Enquanto *Pseudomonas* sp. apresentou maior variação de intensidade para as bandas relacionadas à carbonila e carboxila, *Arthrobacter* sp. apresentou maior alteração nas regiões relacionadas às bandas da dupla ligação.

Yan et al.¹⁹⁴ monitoraram o processo de biodegradação de PEBD por *Enterobacter asburiae* e *Bacillus* sp. através de imageamento de FTIR por ATR. Em ambos os experimentos observou-se o surgimento de bandas de carbonila em 1715 cm^{-1} nas amostras de polímero.

Através do imageamento das superfícies das amostras foi possível verificar que o processo de oxidação do PEBD era heterogêneo. Tal constatação pode explicar os resultados dos experimentos de biodegradação de polímeros utilizando o isolado LaBioMMi 1180, haja vista que as amostras pulverizadas submetidas às análises de infravermelho não eram totalmente representativas do processo de biodegradação devido a sua heterogeneidade.

Syranidou et al.¹⁹⁵ observaram alterações nas bandas de infravermelho do poliestireno dependendo da comunidade a qual a amostra foi exposta e do tipo de degradação ambiental. A intensidade da banda de 1600 cm^{-1} , que corresponde a duplas ligações conjugadas, aumentou nos filmes das comunidades enriquecidas e diminuiu nas comunidades isoladas. Uma diminuição na intensidade das ligações duplas (região 907-965 cm^{-1}) foi observada nas amostras em contato com as comunidades de microrganismos quando comparadas às amostras controle. Adicionalmente, observou-se o surgimento de novas bandas com baixa intensidade nos filmes biodegradados.

Tanto o material residual quanto o controle tiveram suas propriedades físico-químicas caracterizadas para melhor avaliar o processo de biodegradação dos materiais. A Tabela 3.12 lista os parâmetros físico-químicos determinados para as amostras, controle e biodegradadas, para os períodos de 30 e 60 dias. Ao se analisar conjuntamente os valores da temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão cristalina (T_m) e a alteração na % de cristalinidade das amostras é possível ter uma ideia complementar do processo de biodegradação das amostras.

Esses parâmetros relacionam-se e nos dão ideia das alterações no comportamento das cadeias poliméricas. A temperatura de transição vítrea é uma transição de segunda ordem na qual cessa-se a movimentação cadeias poliméricas

da fase amorfa. Também pode ser definida como o limite no qual o valor do volume livre do material permanece constante mesmo com o resfriamento para valores inferiores de temperatura.

A temperatura de fusão é uma transição de primeira ordem na qual ocorre a fusão do material, dependendo do tamanho e da distribuição dos cristalitos ao longo do material. Por fim, a cristalinidade é razão entre a porção cristalina e amorfa do material²⁰⁷.

Tabela 3.12. Caracterização físico-química das amostras do polímero, controle e biodegradadas, nos experimento com o isolado LaBioMMi 1180 (*Bacillus subtilis*).

Polímero	Experimento	Tg(°C)	Tm(°C)	ΔH_m (J/g)	Tc(°C)	ΔH_c (J/g)	% Cristalinidade
PEAD	Controle	-113,8	133,1	177,0	117,5	177,9	60,4
	30 Dias	-113,8	133,0	178,3	117,8	178,5	60,9
	60 Dias		132,9	179,5	117,6	178,2	61,3
PP	Controle	8,7	165,7	62,4	119,5	87,1	30,1
	30 Dias	9,1	164,6	44,4	119,0	113,3	30,2
	60 Dias	13,0	165,0	64,7	119,5	83,4	31,3
PA11	Controle	12,8	183,5	35,0	159,5	32,4	14,4
	30 Dias	32,6	186,8	45,8	161,1	37,4	18,8
	60 Dias	35,8	187,8	47,3	162,3	39,4	19,4
PET	Controle	89,0	235,5	43,9	119,4	10,9	31,4
	30 Dias	104,5	235,7	41,7	119,9	14,9	29,8
	60 Dias	108,8	236,4	47,1	111,5	8,0	33,6
OS	Controle	114,3					0,0
	30 Dias	112,4					0,0
	60 Dias	117,9	182,0	3,3	162,3	4,0	6,2

Por ser mais desordenada e fluída, a fase amorfa dos polímeros é a região alvo para os processos de biodegradação. Esta sofre a ação conjunta dos biossurfactantes e enzimas secretados pelos microrganismos sendo quebrada em oligômeros de menor massa molecular. Portanto, o deslocamento conjunto desses três parâmetros é atribuído às alterações na fase amorfa do polímero, com a consequente redução do volume livre do material e aumento da porção cristalina, devido à biodegradação prioritária da região do material. Tais observações corroboram com o resultado observado para os dados de FT-IR do PEAD.

Adicionalmente, a grande discrepância entre as taxas de biodegradação relatadas na literatura, podem ser explicadas em parte pela falta de caracterização dos polímeros em boa parte dos experimentos. A falta desses dados dificulta a comparação entre os resultados para uma mesma matriz polimérica, visto que a

massa molecular média e a cristalinidade são parâmetros que afetam drasticamente a capacidade de biodegradação dessas matrizes.

Vertommenet et al.²⁰⁸ demonstraram como a cristalinidade e a capacidade das enzimas de hidrolisarem ligações éster presente no PET. A comparação entre a mesma matriz polimérica, com graus de cristalinidade diferentes, demonstrou que enquanto poliéster amorfo apresentavam alta taxa de hidrólise, os substratos altamente cristalinos apresentaram pouca atividade. Ronkvist et al.²⁰⁹ demonstraram que a temperatura de incubação do experimento, além de afetar o crescimento dos microrganismos e a atividade das enzimas, também atua na taxa de biodegradação indiretamente por meio da temperatura de transição vítrea T_g do polímero.

Nos experimentos de biodegradação de PET, o aumento de incubação de 55 para 70 °C aumentou em 7 vezes a taxa inicial de hidrólise do poliéster. Tal alteração foi atribuída em parte à proximidade da temperatura de transição vítrea do polímero. A partir dessa temperatura a mobilidade das cadeias poliméricas da fase amorfa aumenta, juntamente com o volume livre da matriz a atuação das enzimas.

A alteração da cristalinidade durante o processo de biodegradação também foi observada por Sudhakar et al. em 2008¹⁹². Os autores avaliaram a biodegradação de PEBD e PEAD, com e sem pré tratamento térmico, nos estágios iniciais do experimento até o período de 6 meses. Também foi observado o aumento da cristalinidade com o aumento do período de incubação. Enquanto, Balasubramanian et al.¹⁹³ observaram o decréscimo da cristalinidade do PEAD em aproximadamente 7% em apenas 3 meses de biodegradação.

5 Conclusões

A aplicabilidade de emprego do isolado LaBioMMi 1141 em processo de biorremediação de metais pesados foi demonstrada através dos experimentos de planejamento fatorial para a bioadsorção de Fe^{3+} e Cu^{2+} . Tal microrganismo apresentou alta taxa de bioadsorção de Fe^{3+} em algumas das condições experimentais avaliadas e pode-se constatar que os efeitos da temperatura, pH e do tempo de cultivo, respectivamente, são os mais influentes na alteração da taxa de bioadsorção de Fe^{3+} .

Entretanto, comparativamente aos resultados obtidos para a biossorção de Fe^{3+} , os resultados para o Cu^{2+} foram bastante inferiores. A análise dos resultados do planejamento fatorial fracionado tanto para os meios contendo Cu^{2+} quanto para os Cu^{2+} e Fe^{3+} sugerem o aumento da toxicidade do meio de cultura e a consequente interferência no desenvolvimento do microrganismo.

Em ambos os dois planejamentos, a concentração de Cu^{2+} no meio de cultura foi o efeito mais influente no processo de biossorção. A baixa taxa de biossorção, para os dois níveis de concentração avaliados, sugere a alta toxicidade das condições de cultivo para o isolado LaBioMMi 1141.

Adicionalmente, a análise das células intactas do isolado LabioMMi 1141, ao final dos experimentos de biossorção demonstrou diferenças nos espectros dos microrganismos cultivados em alta e baixa concentração dos metais empregados nos experimentos de biossorção.

Em ambos os casos foi possível verificar a presença do íon 901 Da, sugerindo a presença da forma hidrolisada do metabólito Bacilibactina, o qual é reportado como responsável pelo transporte de íons Fe^{3+} do meio para o interior das células.

A análise do padrão da fragmentação na fonte (PSD) sugere tratar-se desse metabólito visto que marcadores esperados para a fragmentação da Bacilibactina são observados no espectro.

Adicionalmente, nos microrganismos cultivados em maiores concentrações de Fe^{3+} e Cu^{2+} é possível visualizar a formação do aduto desses íons com a Bacilibactina. Os experimentos realizados com o metabólito surfactina, isolado a partir dos extratos do LaBioMMi 1137, 1141, 1180 e 1202, demonstraram a capacidade siderofora dessa molécula. Em determinadas condições a mesma também pode complexar íons Fe^{3+} sendo retirados do meio através de adsorção à biomassa ou caso ocorra precipitação do complexo.

Ainda na vertente da mitigação de problemas ambientais foi possível avaliar o potencial do isolado LaBioMMi 1180 na biodegradação de compostos poliméricos. Embora seja um consumo baixo da massa de material adicionado ao meio de cultura, houve 1,6 a 7,6% de redução. Vale ressaltar a potencialidade dessa aplicação tanto por meio da modificação das condições da cultura, composição do

meio de cultura ou fontes adicionais de carbono, por meio da utilização concomitante de processos abióticos e bióticos de degradação; além do estudo dos mecanismos de biodegradação e quais enzimas estão envolvidas.

Na caracterização do material poliméricos residual foi possível verificar alterações nas propriedades físico-químicas dos mesmos quando comparados aos materiais de controle. Tais alterações relacionam-se principalmente com a modificação do grau de cristalinidade do material e a temperatura, sugerindo mudanças na composição da fase amorfa do material.

Adicionalmente, embora não tenha sido detectada nenhuma modificação no perfil do espectro de infravermelho dos materiais biodegradados, foi possível determinar um padrão oligomérico nos extratos dos meios de cultura do PEAD, PP e PS, demonstrando assim o consumo da cadeia polimérica e sua redução das cadeias de oligômeros.

6 Referências

1. ABDILLAHI, H.S., STAFFORD, G.I. FINNIE, J.F. et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Podocarpus sensu latissimo* (s.l.). South African Journal of Botany, v. 76, n. 1, p. 1-24, 2010
2. Bibliografia: Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB258>>. Acesso em: 9 nov. 2017. Plants.usda.gov. (2019). Plants Profile for *Podocarpus macrophyllus* (yew plum pine).
3. Plants Profile for *Podocarpus macrophyllus* (yew plum pine). Plants.usda.gov. Disponível em: <<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=POMA32>>. Acesso em: 9 nov. 2017.
4. *Podocarpus macrophyllus* in Flora of China @ efloras.org. Efloras.org. Disponível em: <http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200005469>. Acesso em: 9 nov. 2017.
5. XUAN, L. Three diterpene dilactone glycosides from *Podocarpus nagi*. Phytochemistry, v. 39, n. 5, p. 1143-1145, 1995.
6. KUO, Y.J., HWANG, S.Y., WU, M.D., LIAO, C.C., LIANG, Y.H., KUO, Y.H., HO, H.O. Cytotoxic constituents from *Podocarpus fasciculus*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v. 56, p. 585-588, 2008.
7. ROY, S.K., QASIM, M.A., KAMIL, M., IIYAS, M. Biflavones from the genus *Podocarpus*. Phytochemistry, v. 26, p. 1985-1987, 1987.
8. ITO, S., KODAMA, M. Norditerpene dilactones from *Podocarpus* species. Heterocycles, v. 4, p. 595-624, 1976.
9. PARK, H.S., YODA, N., FUKAYA, H., AOYAGI, Y., TAKEYA, K. Rakanmakilactones A-F, new cytotoxic sulfur-containing norditerpene dilactones from leaves of *Podocarpus macrophyllus* var. *maki*. Tetrahedron, v. 60, p. 171-177, 2004.

10. PARK, H.S., TAKAHASHI, Y., FUKAYA, H., AOYAGI, Y., KAKEYA, K. SR-Podolactone D, a new sulfoxide-containing norditerpene dilactone from *Podocarpus macrophyllus* var. maki. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 282–284, 2003.
11. SATO, K., SUGAWARA, K., TAKEUCHI, H., PARK, H.S., AKIYAMA, T., KOYAMA, T., AOYAGI, Y., TAKEYA, K., TSUGANE, T., SHIMURA, S. Antibacterial novel phenolic diterpenes from *Podocarpus macrophyllus* D. Don. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 56, p. 1–22, 2008.
12. KOBAYASHI, M., NAKANISHI, K., KOREEDA, M. The moulting hormone activity of ponasterones on *Musca domestica* (Diptera) and *Bombyx mori* (Lepidoptera). *Steroids*, v. 9, p. 529–536, 1967.
13. OKAUCHI, TETSUO, TAKAMUKU, SHOJITAMURA, SABURO et al. Method for increasing yield of silkworm cocoons employing juvenile and moulting hormones. Depositante: Testsuo Okauchi. 3941879. Depósito: 12/13/1973. Concessão: 03/02/1976.
14. CHENG, K.T., HSU, F.L., CHEN, S.H., HSIEH, P.K., HUANG, H.S., LEE, C.K., LEE, M.H. New constituent from *Podocarpus macrophyllus* var. macrophyllus shows anti-tyrosinase effect and regulates tyrosinase-related proteins and mRNA in human epidermal melanocytes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 55, p. 757–761, 2007.
15. JOSEPH, B., RANJAN PATRA, R., LAWRENCE, R. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.*, v.1, n. 2, p. 141–152, 2012.
16. PATRIQUIN, D., DÖBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizo-sphere of maize and other grasses in Brazil. *Can. J. Microbiol.*, v. 24, n.6, p. 734–742, 1978.
17. BELL, C., DICKIE, G., HARVEY, W., CHAN, J. Endophytic bacteria in grapevine. *Can. J. Microbiol.*, v. 41, n. 1, p. 46–53, 1995.
18. VERMA, P., YADAV, A.N., KAZY, S.K., SAXENA, A.K., SUMAN, A., Evaluating the diversity and phylogeny of plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum*) growing in central zone of India. *Int. J. Current Microbiol. Appl. Sci.*, v. 3, n. 5, p. 432–447, 2014.
19. VERMA, PRIYANKA, YADAV, AJAR NATHKHANNAM, KAZY SUFIA et al. Assessment of genetic diversity and plant growth promoting attributes of psychrotolerant bacteria allied with wheat (*Triticum aestivum*) from the northern hills zone of India. *Annals of Microbiology*, v. 65, n. 4, p. 1885-1899, 2015.
20. RYAN, R.P., GERMAINE, K., FRANKS, A., RYAN, D.J., DOWLING, D.N. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 278, n. 1, p. 1–9, 2008.
21. HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W., KLOEPPER, J. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.*, v. 43, n. 10, p. 895–914, 1997.
22. PRASAD, R., KUMAR, M., VARMA, A., 2015. Role of PGPR in soil fertility and plant health. In: EGAMBERDIEVA, D., SHRIVASTAVA, S., VARMA, A. **Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants**. Ed. Springer International Publishing, Switzerland, 2000, pp. 247–260.
23. GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, v. 41, n. 2, p. 109–117, 1995.
24. TILAK, K., RANGANAYAKI, N., PAL, K., DE, R., SAXENA, A., NAUTIYAL, C.S., MITTAL, S., TRIPATHI, A., JOHRI, B. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.*, v. 89, n. 1, p. 136–150, 2005.

25. VERMA, P., YADAV, A.N., KUMAR, V., SINGH, D.P., SAXENA, A.K., 2017b. Beneficial plant-microbes interactions: biodiversity of microbes from diverse extreme environments and its impact for crops improvement. In: SINGH, D.P., SINGH, H.B., PRABHA, R. **Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives**. Springer, Singapore, 2017, p. 29 -54.
26. YADAV, A.N. Agriculturally important microbiomes: biodiversity and multifarious PGP attributes for amelioration of diverse abiotic stresses in crops for sustainable agriculture. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, v. 1, n. 1, p. 1–4, 2017.
27. YADAV, A.N., VERMA, P., KOUR, D., RANA, K.L., KUMAR, V., SINGH, B., CHAUHAN, V.S., SUGITHA, T.C.K., SAXENA, A.K., DHALIWAL, H.S. Plant microbiomes and its beneficial multifunctional plant growth promoting attributes. *Int. J. Environ. Sci. Nat. Resour.* V. 3, n. 1, 1–8, 2017.
28. NETO, P.A.S.P., JOÃO, AZEVEDO, J.L., ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* n. 29, p. 62-76, 2002.
29. NAIK, B. S. Developments in taxol production through endophytic fungal biotechnology: a review. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2019.
30. AJIKUMAR, P.K., XIAO, W.H., TYO, K.E.J., WANG, Y., SIMEON, F., LEONARD, E., MUCHA, O., PHON, T.H., PFEIFER, B., STEPHANOPOULOS, G. Isoprenoid Pathway Optimization for Taxol Precursor Overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, v.330, n. 6000, p. 70-74, 2010.
31. HAAS, M.J. Paclitaxel plants routes in bacteria. *SciBX*, v. 3, n. 40, 2010
32. EL-SAYED, A.S.A., SAFAN, S., MOHAMED, N.Z., SHABAN, L., ALI, G.S., SITOHY, M.Z. Induction of Taxol biosynthesis by *Aspergillus terreus*, endophyte of *Podocarpus gracilior* Pilger, upon intimate interaction with the plant endogenous microbes. *Process Biochemistry*, v. 71, p. 31-40, 2018.
33. SCHULZ, B., ROMMERT, A.K., DAMMANN, U., AUST, H.J., STRACK, D. The endophyte host interaction: a balanced antagonism? *Mycol. Res.* v. 103, p. 1275–1283, 1999.
34. QAWASMEH, A., OBIED, H.K., RAMAN, A., WHEATLEY, W. Influence of fungal endophyte infection on phenolic content and antioxidant activity in grasses: interaction between *Lolium perenne* and different strains of *Neotyphodium lolii*. *J. Agric. Food. Chem.* v. 60, p. 3381-3388, 2012.
35. STROBEL, G.A., HESS, W.M. Glucosylation of the peptide leucinostatin A, produced by an endophytic fungus of European yew, may protect the host from leucinostatin toxicity. *Chem. Biol.* v. 4, p.529-536, 1997.
36. TIAN, Y., AMAND, S., BUISSON, D., KUNZ, C., HACHETTE, F., DUPONT, J., NAY, B., PRADO, S. The fungal leaf endophyte *Paraconiothyrium variabile* specifically metabolizes the host- plant metabolome for its own benefit. *Phytochemistry*, v. 108, p. 95-101, 2014.
37. LUDWIG-MÜLLER, J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnology Letters*, v. 37, n. 7, p. 1325–1334, 2015.
38. YADAV, AJAR N., KUMAR, VINODHALIWAL, HARCHARAN S. et al. Microbiome in Crops: Diversity, Distribution, and Potential Role in Crop Improvement. *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*, p. 305-332, 2018.
39. SUMAN, A., YADAV, A.N., VERMA, P. Endophytic microbes in crops: diversity and beneficial impact for sustainable agriculture. In: SINGH, D.P., ABHILASH, P.C., PRABHA, R. **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity**, vol. 1, Research Perspectives. Springer, New Delhi, Indi, 2016, pp. 117–143.
40. YADAV, A.N., VERMA, P., KUMAR, S., KUMAR, V., KUMAR, M., SINGH, B.P., SAXENA, A.K., DHALIWAL, H.S., 2017e. Actinobacteria from rhizosphere:

- molecular diversity, distributions and potential biotechnological applications. In: SINGH, B.P., GUPTA, V.K., PASSARI, A.K., **Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications**. Elsevier, USA. 2017, p 13-41.
41. YADAV, A.N., VERMA, P., SACHAN, S.G., KAUSHIK, R., SAXENA, A.K. Psychrotrophic microbiomes: molecular diversity and beneficial role in plant growth promotion and soil health. In: PANPATTE, D.G., JHALA, Y.K., SHELAT, H.N., VYAS, R.V. **Microorganisms for Green Revolution**. Springer, Singapore. 2017, p 197-240.
 42. YADAV, A.N., KUMAR, R., KUMAR, S., KUMAR, V., SUGITHA, T.C.K., SINGH, B., CHAUHAN, V.S., DHALIWAL, H.S., SAXENA, A.K. Beneficial microbiomes: biodiversity and potential biotechnological applications for sustainable agriculture and human health. *J. Appl. Biol. Biotechnol.*, v. 5, n. 6, p. 45–57, 2017.
 43. SINGHAL, NEELJA, KUMAR, MANISHKANAUJIA, PAWAN K. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 2015.
 44. HOFFMANN, EDMOND DESTROOBANT, VINCENT. *Mass spectrometry*. Chichester: John Wiley & Sons, 2012.
 45. CARBONNELLE, ETIENNE, GROHS, PATRICKJACQUIER, HERVÉ et al. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. *Journal of Microbiological Methods*, v. 89, n. 2, p. 133-136, 2012.
 46. Bibliografia: Disponível em: <<http://www.mmass.org/>>. Acesso em: 9 nov. 2017. <http://www.mmass.org/>.
 47. Bibliografia: Disponível em: <<http://www.sing-group.org/mass-up/>>. Acesso em: 9 nov. 2017. <http://www.sing-group.org/mass-up/>.
 48. Bibliografia: Disponível em: <<https://omictools.com/pkdaclass-tool>>. Acesso em: 9 nov. 2017. <https://omictools.com/pkdaclass-tool>.
 49. Bibliografia: Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/MALDIquant/index.html>>. Acesso em: 9 nov. 2017. <https://cran.r-project.org/web/packages/MALDIquant/index.html><https://omictools.com/pkdaclass-tool>.
 50. BÖHME, K. et al. SpectraBank: An open access tool for rapid microbial identification by MALDI-TOF MS fingerprinting. *ELECTROPHORESIS*, v. 33, n. 14, p. 2138-2142, 2012.
 51. RAUS, M., ŠEBELA, M. BIOSPEAN: A Freeware Tool for Processing Spectra from MALDI Intact Cell/Spore Mass Spectrometry. *J Proteomics Bioinform*, v. 6, p.282-287, 2013.
 52. SEUYLEMEZIAN, ARMAN, ARONSON, HEIDI S.TAN, JAMES et al. Development of a Custom MALDI-TOF MS Database for Species-Level Identification of Bacterial Isolates Collected From Spacecraft and Associated Surfaces. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018.
 53. FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, C.; TORRES-CORRAL, Y.; SANTOS, Y. Use of ribosomal proteins as biomarkers for identification of *Flavobacterium psychrophilum* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Proteomics*, v. 170, p. 59-69, 2018.
 54. SUAREZ, S. et al. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Journal of Microbiological Methods*, v. 94, n. 3, p. 390-396, 2013.
 55. SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 2015.
 56. HRABÁK, J.; CHUDÁČKOVÁ, E.; WALKOVÁ, R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection

- of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis. *Clinical Microbiology Review*, v. 26, n. 1, p. 103-114.
57. IDELEVICH, E. et al. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 24, n. 7, p. 738-743, 2018.
58. VRIONI, G. et al. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Annals of Translational Medicine*, v. 6, n. 12, p. 240-240, 2018.
59. BURCKHARDT, I.; ZIMMERMANN, S. Susceptibility Testing of Bacteria Using Maldi-Tof Mass Spectrometry. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018.
60. PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. in: FOKKEMA, N. J.; HEUVEL, J. VAN DEN. **Microbiology of the Phyllosphere**. Cambridge: University Press, 1986, p. 175-87.
61. DICKINSON, D. et al. MALDI-TOFMS compared with other polyphasic taxonomy approaches for the identification and classification of *Bacillus pumilus* spores. *Journal of Microbiological Methods*, v. 58, n. 1, p. 1-12, 2004.
62. SCHMIDT, O.; KALLOW, W. Differentiation of indoor wood decay fungi with MALDI-TOF mass spectrometry. *Holzforschung*, v. 59, n. 3, 2005.
63. Bibliografia: Disponível em: <<https://folk.uio.no/ohammer/past/>>. Acesso em: 15 set. 2017. <https://folk.uio.no/ohammer/past/https://omictools.com/pkdaaclass-tool>
64. MIGUEL, P. S. B., MARCELO OLIVEIRA, M. N. V., DELVAUX, J. C., DE JESUS. G. L., BORGES, A. C., TOTOLA, M. R., NEVES, J. C. L., M. D. Diversity and distribution of the endophytic bacterial community at different stages of Eucalyptus growth. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 109, n. 6, p. 755-771, 2016.
65. SHEN, S. Y., FUTHORPE, R. Seasonal variation of bacterial endophytes in urban trees. *Frontiers in microbiology*, v. 6, n. 427, p. 1-13, 2015.
66. PROENÇA, D. N., FRANCISCO, R., KUBLIK, S., SCHÖLER, A., VESTERGAARD, G., SCHLOTTER, M., & MORAIS, P. V. The Microbiome of Endophytic, Wood Colonizing Bacteria from Pine Trees as Affected by Pine Wilt Disease. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.
67. CARRELL, A. A., & FRANK, A. C. *Pinus flexilis* and *Picea engelmannii* share a simple and consistent needle endophyte microbiota with a potential role in nitrogen fixation. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 1–11, 2014.
68. CARPER, D. L., CARRELL, A. A., KUEPPERS, L. M., & FRANK, A. C. Bacterial endophyte communities in *Pinus flexilis* are structured by host age, tissue type, and environmental factors. *Plant and Soil*, v. 428, p. 335–352, 2018.
69. Rabinovitch, L., de Oliveira, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de Bacillus e gêneros esporulados aeróbios correlatos**. Rabinovitch, L., de Oliveira, Ed. – Rio de Janeiro :Montenegro Comunicação, 2015. P. 160.
70. NICHOLSON, W. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, v. 59, n. 3, p. 410-416, 2002.
71. Bibliografia: Disponível em: <<http://www.bacterio.net/bacillus.html>>Acesso em: 12 dez. 2017. <http://www.bacterio.net/bacillus.html>.
72. STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.*, v. 56, p. 845–857, 2005.
73. ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, v. 9, ed. 4, p. 1084-1090, 2007.

74. ROMERO, D.; VICENTE, A.; OLMOS, J.L.; DÁVILA, J.C.; PÉREZ-GARCÍA, A. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podospaera fusca*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 969-976, 2007.
75. VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S.S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 12, p. 6210-6219, 2002.
76. GONG, A. et al. Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium graminearum*. *PLOS ONE*, v. 10, n. 2, p. e0116871, 2015.
77. LIU, X.Y.; YANG, S.Z.; MU, B.Z. Isolation and characterization of a C-12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. *Journal of Peptide Science*, v. 14, n. 7, p. 864-875, 2008.
78. CAULIER, S. et al. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, 2019.
79. SCHULZ, S., AND DICKSCHAT, J. S. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat. Prod. Rep.*, n. 24, p. 814–842, 2007.
80. Bibliografia: Disponível em: <1.
<http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml>>Acesso em: 08 jun. 2018. 1.
<http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml>.
81. CHRISTIANSON, D.V. Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chemical Reviews*, v. 117, p. 11570-11648, 2017.
82. ZHOU, K., ZOU, R., STEPHANOPOULOS, G., & TOO, H. P. Metabolite Profiling Identified Methylerythritol Cyclodiphosphate Efflux as a Limiting Step in Microbial Isoprenoid Production. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, 2012.
83. SCHULZ, S., DICKSCHAT, J. S. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat. Prod. Rep.*, v. 24, p. 814–842, 2007. doi: 10.1039/b507392h
84. COOSEMANS, J. Dimethyl disulphide (DMDS): a potential novel nematicide and soil disinfectant. *Acta Hortic.*, v. 698, p. 57–64, 2005.
85. GERIK, J. S. Evaluation of soil fumigants applied by drip irrigation for liatris production. *Plant Dis.*, v. 89, p. 883–887, 2005.
86. KAI, M., HAUSTEIN, M., MOLINA, F., PETRI, A., SCHOLZ, B., PIECHULLA, B. Bacterial volatiles and their action potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 81, p. 1001–1012, 2009.
87. CHERNIN, L., TOKLIKISHVILI, N., OVADIS, M., KIM, S., BEN-ARI, J., KHMEL, I., et al. Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles. *Environ. Microbiol. Rep.*, v. 3, p. 698–704, 2011.
88. BRUIJN, F. J. DE. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*. Hoboken, N.J.: Wiley Blackwell, 2013.
89. SCHMIDT, RUTH, CORDOVEZ, VIVIANEDE BOER, WIETSE et al. Volatile affairs in microbial interactions. *The ISME Journal*, v. 9, n. 11, p. 2329-2335, 2015.
90. EFFMERT, UTA, KALDERÁS, JANINEWARNKE, RENÉ et al. Volatile Mediated Interactions Between Bacteria and Fungi in the Soil. *Journal of Chemical Ecology*, v. 38, n. 6, p. 665-703, 2012.
91. GARBEVA, PAOLINA, HORDIJK, CORNELISGERARDS, SASKIA et al. Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas*. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 87, n. 3, p. 639-649, 2013.

92. MINERDI, D., BOSSI, S., MAFFEI, M.E., GULLINO, M.L., GARIBALDI, A. Bacterial ectosymbionts and virulence silencing in a *Fusarium oxysporum* strain. *FEMS Microbiol Ecol.*, v.76, p. 342–351, 2011.
93. GÜRTLER, HANNE, PEDERSEN, RITANTHONI, UFFE et al. Albaflavenone, a sesquiterpene ketone with a zizaene skeleton produced by a streptomycete with a new rope morphology. *The Journal of Antibiotics*, v. 47, n. 4, p. 434-439, 1994.
94. TAKAMATSU, SATOSHI, LIN, XINARA, AYAKO et al. Characterization of a silent sesquiterpenoid biosynthetic pathway in *Streptomyces avermitilis* controlling epi-isozizaene albaflavenone biosynthesis and isolation of a new oxidized epi-isozizaene metabolite. *Microbial Biotechnology*, v. 4, n. 2, p. 184-191, 2010.
95. BRAÑA, ALFREDO F., RODRÍGUEZ, MIRIAMPAHARI, PALLAB et al. Activation and silencing of secondary metabolites in *Streptomyces albus* and *Streptomyces lividans* after transformation with cosmids containing the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. *Archives of Microbiology*, v. 196, n. 5, p. 345-355, 2014.
96. TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother*, p. 2474–2478, 2005.
97. DE BOER, W. *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, v. 54, n. 3, p. 857-864, 2004.
98. KORPI, A.; JÄRNBERG, J.; PASANEN, A. Microbial Volatile Organic Compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 39, n. 2, p. 139-193, 2009.
99. INSAM, H.; SEEWALD, M. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biology and Fertility of Soils*, v. 46, n. 3, p. 199-213, 2010.
100. BITAS, V. et al. Sniffing on Microbes: Diverse Roles of Microbial Volatile Organic Compounds in Plant Health. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 26, n. 8, p. 835-843, 2013.
101. TEALE, W.; PAPONOV, I.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 7, n. 11, p. 847-859, 2006.
102. U, Y. et al. Cadmium interferes with maintenance of auxin homeostasis in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Physiology*, v. 170, n. 11, p. 965-975, 2013.
103. KAZAN, K. Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. *Annals of Botany*, v. 112, n. 9, p. 1655-1665, 2013.
104. EGAMBERDIEVA, D. et al. Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for Plants to Balance Stress and Fitness. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 2017.
105. CREUS, C.; SUELDO, R.; BARASSI, C. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Canadian Journal of Botany*, v. 82, n. 2, p. 273-281, 2004.
106. COHEN, A.C.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in *Arabidopsis* plants. *Plant Growth Regul.*, v. 54, p. 97–103, 2008.
107. COHEN, A. C.; TRAVAGLIA, C. N.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. N. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany.*,v. 87,p. 455–462, 2009.
108. COHEN, A.C.; MORENO, D.; PONTIN, M.; BERLI, F. J.; TRAVAGLIA, C. N.; REINOSO H.; et al. Inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp 245 increases growth

- and seed yield in *Arabidopsis thaliana* plants submitted to water hindrance by modifying root architecture and enhancing ABA and proline. *Plant Soil* 2012.
109. BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J. J.; LEYVA, L.A.; HERNANDEZ, J-P.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biol Fertil Soils.*, v. 42, p. 279–285, 2006.
110. BERLI, F.J.; MORENO, D.; PICCOLI, P.; HESPANHOL-VIANA, L.; SILVA, M.F.; BRESSAN-SMITH, R. et al. Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet- absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant Cell Environ.*, v. 33, p. 1–10., 2010.
111. TRAVAGLIA, C; COHEN, A. C.; REINOSO, H.; CASTILLO, C.; BOTTINI R. Exogenous abscisic acid increases carbohydrate accumulation and redistribution to the grains in wheat grown under field conditions of soil water restriction. *J Plant Growth Regul.*, v. 26, p. 285–289, 2007.
112. SHAHZAD, R. et al. Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*. *Environmental and Experimental Botany*, v. 136, p. 68-77, 2017.
113. SALOMON, M. et al. Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine. *Physiologia Plantarum*, v. 151, n. 4, p. 359-374, 2013.
114. PARK, YEON-GYEONG, MUN, BONG-GYUKANG, SANG-MO et al. *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLOS ONE*, v. 12, n. 3, p. e0173203, 2017.
115. CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: Buchanan B, Grissem W, Jones R, editors. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists. P. 850–929, 2000.
116. TUDZYNSKI, B.; MIHLAN, M.; ROJAS, M.C.; LINNEMANNSTONS, P.; GASKIN, P.; HEDDEN, P. Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi*: des and P450-3 encode GA4 desaturase and the 13-hydroxylase, respectively. *J Biol Chem.* v. 278, p. 28635–28643, 2003.
117. BOTTINI, R.; CASSAN, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotech.* v. 65, p. 497–503, 2004.
118. MORRISON, E.D.; CHAMBERS, J.; LOWRY, L.; KIM, G.; ANTEROL, A. A.; BENDER, K.; PETER R. J. Gibberellin biosynthesis in bacteria: Separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEBS Letters.* v. 583, p. 475–480, 2009.
119. KUCEY, R. M. N. Plant growth-altering effects of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus C-11-25* on two wheat cultivars. *J Appl Bacteriol.* v. 64, p. 187–196, 1988.
120. FULCHIERI, M.; LUCANGELI, C.; BOTTINI, R. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellins content of corn seedling roots. *Plant Cell Physiol.* v. 34, p. 1305–1309, 1993.
121. LUCANGELI, C.; BOTTINI, R. Reversion of dwarfism in dwarf-1 maize (*Zea mays* L.) and dwarf-x rice (*Oryza sativa* L.) mutants by endophytic *Azospirillum* spp. *Biocell*, v. 20, p. 223–228, 1996.

122. LUCANGELI, C.; BOTTINI, R. Effects of Azospirillum spp. on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. *Symbiosis*, v. 23, p. 63–72, 1997.
123. BASTIAN, F.; RAPPARINI, F.; BARALDI, R.; PICCOLI, P.; BOTTINI, R. Inoculation with *Acetobacter diazotrophicus* increases glucose and fructose content in shoots of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Symbiosis*, v. 27, p. 147–156, 1999.
124. GUTIÉRREZ-MAÑERO, F. J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBENZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.R.; TALON, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plant.*, v. 111, p. 206–211, 2001.
125. NEMHAUSER, J. L.; HONG, F.; CHORY, J. Different plant hormones regulate similar processes through largely non overlapping transcriptional responses. *Cell.*, v. 126, p. 467–475, 2006.
126. WITHERS, S. et al. Identification of Isopentenol Biosynthetic Genes from *Bacillus subtilis* by a Screening Method Based on Isoprenoid Precursor Toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 19, p. 6277-6283, 2007.
127. ARGUELLES-ARIAS, A. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, v. 8, n. 1, p. 63, 2009.
128. PATHAK, K.; BOSE, A.; KEHARIA, H. Characterization of Novel Lipopeptides Produced by *Bacillus tequilensis* P15 Using Liquid Chromatography Coupled Electron Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC–ESI–MS/MS). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 20, n. 2, p. 133-143, 2013.
129. SCHOLZ, R., MOLOHON, K. J. NACHTIGALL, J. et al. Plantazolicin, a Novel Microcin B17/Streptolysin S-Like Natural Product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*, v. 193, n. 1, p. 215-224, 2010.
130. LI, X. et al. Antifungal Activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the Biocontrol of Peach Gummosis. *PLOS ONE*, v. 11, n. 9, p. e0162125, 2016.
131. ODDOYE, E. O. K., PHIL, A. B. M., GYEDU-AKOTO, E. Cocoa and Its By-Products: Identification and Utilization. In: WATSON, R., PREEDY, V., ZIBADI, S. **Chocolate in health and nutrition**. New York: Humana Press, 2013. p. 23-37.
132. CHIAPPINI, C. C. Aromas naturais produzidos por microrganismos. *Food Ingredients Brasil*, n. 4, p. 22-24, 2008.
133. TYC, O. et al. Volatiles in Inter-Specific Bacterial Interactions. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 2015.
134. KAI, M. et al. Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, n. 6, p. 1001-1012, 2008.
135. LI, QILI, NING, PINGZHENG, LU et al. Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. *Postharvest Biology and Technology*, v. 58, n. 2, p. 157-165, 2010.
136. HUANG, CHIEN-JUI, TSAY, JIA-FANGCHANG, SHU-YU et al. Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L. *Pest Management Science*, v. 68, n. 9, p. 1306-1310, 2012.
137. WANG, CHANGLU, WANG, ZHIFANGQIAO, XI et al. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. *FEMS Microbiology Letters*, v. 341, n. 1, p. 45-51, 2013.
138. KANCHISWAMY, CHIDANANDA NAGAMANGALA, MALNOY, MICKAELMAFFEI, MASSIMO E. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, 2015.

139. DE VRIEZE, MOUT, PANDEY, PIYUSHBUHEL, THOMAS D. et al. Volatile Organic Compounds from Native Potato-associated *Pseudomonas* as Potential Antioomycete Agents. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 2015.
140. MELDAU, DOROTHEA G., LONG, HOANG H. BALDWIN, IAN T. A native plant growth promoting bacterium, *Bacillus* sp. B55, rescues growth performance of an ethylene-insensitive plant genotype in nature. *Frontiers in Plant Science*, v. 3, 2012.
141. PEÑUELAS, J., ASENSIO, D. THOLL, D. et al. Biogenic volatile emissions from the soil. *Plant, Cell & Environment*, v. 37, n. 8, p. 1866-1891, 2014.
142. KENNEDY, GEORGE G. TOMATO, PESTS, PARASITOIDS, AND PREDATORS: Tritrophic Interactions Involving the Genus *Lycopersicon*. *Annual Review of Entomology*, v. 48, n. 1, p. 51-72, 2003.
143. NTALLI, NIKOLETTA G., MANCONI, FRANCESCA LEONTI, MARCO et al. Aliphatic Ketones from *Ruta chalepensis* (Rutaceae) Induce Paralysis on Root Knot Nematodes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 13, p. 7098-7103, 2011.
144. GARBEVA, PAOLINA, HORDIJK, CORNELIS GERARDS, SASKIA et al. Volatile-mediated interactions between phylogenetically different soil bacteria. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, 2014.
145. SONG, CHUNXU, SCHMIDT, RUTH DE JAGER, VICTOR et al. Exploring the genomic traits of fungus-feeding bacterial genus *Collimonas*. *BMC Genomics*, v. 16, n. 1, 2015.
146. CANE, DAVID E. IKEDA, HARUO. Exploration and Mining of the Bacterial Terpenome. *Accounts of Chemical Research*, v. 45, n. 3, p. 463-472, 2011.
147. YAMADA, YUUKI, KUZUYAMA, TOMOHISAKOMATSU, MAMORU et al. Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 3, p. 857-862, 2014.
148. ZHENG, DAN, DING, NANJIANG, YI et al. Albaflavenoid, a new tricyclic sesquiterpenoid from *Streptomyces violascens*. *The Journal of Antibiotics*, v. 69, n. 10, p. 773-775, 2016.
149. HEFTER, J., RICHNOW, H. H. FISCHER, U. et al. (-)-Verrucosan-2-ol from the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*: first report of a verrucosane-type diterpenoid from a prokaryote. *Journal of General Microbiology*, v. 139, n. 11, p. 2757-2761, 1993.
150. CHUCK, J.-A. BARROW, K. D. The isolation of isoagathenediol: a new tricyclic diterpene from the lipids of *Rhodospirillum rubrum*. *Microbiology*, v. 141, n. 10, p. 2659-2663, 1995.
151. SPYERE, ALLAN, ROWLEY, DAVID C. JENSEN, PAUL R. et al. New Neoverrucosane Diterpenoids Produced by the Marine Gliding Bacterium *Saprospira grandis*. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 6, p. 818-822, 2003.
152. MORA, ISABEL, CABREFIGA, JORDIMONTESINOS, EMILIO. Cyclic Lipopeptide Biosynthetic Genes and Products, and Inhibitory Activity of Plant-Associated *Bacillus* against Phytopathogenic Bacteria. *PLOS ONE*, v. 10, n. 5, p. e0127738, 2015.
153. TORRES, M. J., BRANDAN, C. PÉREZPETROSELLI, G. et al. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological Research*, v. 182, p. 31-39, 2016.
154. SAJITHA, K. L., DEV, SUMA ARUNMARIA FLORENCE, E. J. Identification and Characterization of Lipopeptides from *Bacillus subtilis* B1 Against Sapstain

Fungus of Rubberwood Through MALDI-TOF-MS and RT-PCR. *Current Microbiology*, v. 73, n. 1, p. 46-53, 2016.

155. KIM, P.I. Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 20, n. 1, p. 138–145, 2010.

156. Bibliografia: Disponível em: <

<https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/acidente-mariana-mg-seus-impactos-ambientais.htm>>Acesso em: 05 fev.

2019 <https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/acidente-mariana-mg-seus-impactos-ambientais.htm>.

157. Bibliografia: Disponível em: <<https://noticias.uol.com.br/ultimas-noticias/agencia-estado/2019/01/29/brumadinho-deve-ser-maior-desastre-mundial-em-barragens-na-decada-diz-oit.htm>>Acesso em: 05 fev. 2019.

<https://noticias.uol.com.br/ultimas-noticias/agencia-estado/2019/01/29/brumadinho-deve-ser-maior-desastre-mundial-em-barragens-na-decada-diz-oit.htm>.

158. Bibliografia: Disponível em: <<https://www.otempo.com.br/cidades/minas-j%C3%A1-sofreu-com-outros-rompimentos-de-barragens-1.1159501>>05 fev.

2019 <https://www.otempo.com.br/cidades/minas-j%C3%A1-sofreu-com-outros-rompimentos-de-barragens-1.1159501>

159. Bibliografia: Disponível em: < <https://www.otempo.com.br/cidades/brasil-tem-1-118-barragens-com-risco-alto-de-rompimento-5-em-mg1.2129162>>05 fev. 2019.

<https://www.otempo.com.br/cidades/brasil-tem-1-118-barragens-com-risco-alto-de-rompimento-5-em-mg1.2129162>

160. Bibliografia: Disponível em: <

https://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2019/02/26/interna_gerais,1033727/lama-da-barragem-ja-afetou-fornecimento-de-agua-em-16-municipios.shtml>Acesso em:

05 fev. 2019.

https://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2019/02/26/interna_gerais,1033727/lama-da-barragem-ja-afetou-fornecimento-de-agua-em-16-municipios.shtml

161. Bibliografia: Disponível em: <

http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/Rio_Doce/ibama_mapa_consolicao_plumas_foz_rio_doce_10022017.jpg>Acesso em: 05 fev. 2019.

http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/Rio_Doce/ibama_mapa_consolicao_plumas_foz_rio_doce_10022017.jpg

162. Bibliografia: Disponível em: <

<http://www.icmbio.gov.br/portal/publicacoes?id=7862%3Adocumentos-rio-doce>

http://www.consultaesic.cgu.gov.br/busca/dados/Lists/Pedido/Attachments/612349/R ESPOSTA PEDIDO_02680002082201705%20-%20sumario de analises UERJ_21Set2017.pdf>Acesso em: 05 fev. 2019.

<http://www.icmbio.gov.br/portal/publicacoes?id=7862%3Adocumentos-rio-doce>

http://www.consultaesic.cgu.gov.br/busca/dados/Lists/Pedido/Attachments/612349/R ESPOSTA PEDIDO_02680002082201705%20-%20sumario de analises UERJ_21Set2017.pdf

http://www.consultaesic.cgu.gov.br/busca/dados/Lists/Pedido/Attachments/612349/R ESPOSTA PEDIDO_02680002082201705%20-%20sumario de analises UERJ_21Set2017.pdf

163. Bibliografia: Disponível em: < <https://noticias.r7.com/minas-gerais/laudo-comprova-alta-concentracao-de-metais-pesados-em-lama-de-barragens-13112015>>Acesso em: 05 fev. 2019.

<https://noticias.r7.com/minas-gerais/laudo-comprova-alta-concentracao-de-metais-pesados-em-lama-de-barragens-13112015>

164. Bibliografia: Disponível em: <

<http://file.abiplast.org.br/file/download/2018/Perfil-2017.pdf>>Acesso em: 05 fev. 2019. <http://file.abiplast.org.br/file/download/2018/Perfil-2017.pdf>

165. Bibliografia: Disponível em: < <https://www.bbc.com/portuguese/geral-47614367> <https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/oceano-plastico-triste-realidade.htm>> Acesso em: 05 fev. 2019. <https://www.bbc.com/portuguese/geral-47614367> <https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/oceano-plastico-triste-realidade.htm>
166. Bibliografia: Disponível em: <https://revistagalileu.globo.com/Ciencia/MeioAmbiente/noticia/2018/03/estudo-afirma-que-poluicao-de-plastico-nos-oceanos-triplicara-ate-2025.html> > Acesso em: 05 fev. 2019. <https://revistagalileu.globo.com/Ciencia/MeioAmbiente/noticia/2018/03/estudo-afirma-que-poluicao-de-plastico-nos-oceanos-triplicara-ate-2025.html>
167. HOPEWELL, JEFFERSON, DVORAK, ROBERTKOSIOR, EDWARD. Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 364, n. 1526, p. 2115-2126, 2009.
168. ANDRADY, ANTHONY L. Assessment of Environmental Biodegradation of Synthetic Polymers. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, v. 34, n. 1, p. 25-76, 1994.
169. SWIFT G., WILES D. Degradable polymers and plastics in landfill sites. *Encyclopedia Polym. Sci. Technol.*, v. 9, p. 40–51, 2004.
170. LAW, KARA LAVENDER. Plastics in the Marine Environment. *Annual Review of Marine Science*, v. 9, n. 1, p. 205-229, 2017.
171. CHOUDHARY, M., KUMAR, R., DATTA, A., NEHRA, V., & GARG, N. Bioremediation of Heavy Metals by Microbes. *Bioremediation of Salt Affected Soils: An Indian Perspective*, p. 233–255, 2017.
172. CRUSBERG, T. C. MARK, S. S. Heavy Metal Remediation of Wastewaters by Microbial Biotraps. *Bioremediation*, p. 123-137, 2000.
173. CONGEEVARAM, SHANKAR, DHANARANI, SRIDEVIPARK, JOONHONG et al. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *Journal of Hazardous Materials*, v. 146, n. 1-2, p. 270-277, 2007.
174. WHITACRE, DAVID M. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 223*. Dordrecht: Springer, 2012.
175. Bibliografia: Disponível em: < <https://www.astm.org/Standards/G22.htm>> Acesso em: 03 mai. 2018. ASTM G22-76
176. AWASTHI, SHRADDHA, SRIVASTAVA, NEHASINGH, TRIPTI et al. Biodegradation of thermally treated low density polyethylene by fungus *Rhizopus oryzae* NS 5. *3 Biotech*, v. 7, n. 1, 2017.
177. Bibliografia: Disponível em: < <https://www.astm.org/Standards/D5477.htm>> Acesso em: 03 mai. 2018. ASTM D5477-18.
178. Bibliografia: Disponível em: < <https://www.astm.org/Standards/D7028.htm>> Acesso em: 03 mai. 2018. ASTM ASTM D7028-07.
179. Bibliografia: Disponível em: < <https://www.astm.org/Standards/D3418>> Acesso em: 03 mai. 2018. ASTM ASTM D3418-15.
180. Bibliografia: Disponível em: < <https://www.astm.org/Standards/F2625.htm>> Acesso em: 03 mai. 2018. ASTM F2625-10.
181. Bibliografia: Disponível em: <<http://www.tainstruments.com/pdf/literature/TN048.pdf> > Acesso em: 03 mai. 2018. *termal applicantion notes*.

182. Bibliografia: Disponível em: < <https://estore.onthehub.com>> Acesso em: 03 ago. 2015. <https://estore.onthehub.com>.
183. Bibliografia: Disponível em: < <http://www.himedialabs.com/TD/M1383.pdf>> Acesso em: 03 ago. 2015. *Bacillus medium*.
184. NETO, BENICIO DE BARROS; SCARMINIO, IEDA SPACINO; BRUNS, ROY EDWARDS. Como fazer experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria. 4^a edição, editora Bookman, 2010, Campinas São Paulo.
185. DERTZ, E. A.; XU, J.; STINTZI, A.; RAYMOND, K. N. Bacillibactin-Mediated Iron Transport in *Bacillus subtilis*. *JACS*, v. 128, n. 1, p. 22-23, 2006.
186. MIETHKE, M.; KLOTZ, O.; LINNE, U.; MAY, J. J.; BECKERING, C. L.; MARAHIEL, M. A. Ferri-bacillicatin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, v. 61, n. 6, p. 1413-1427, 2006.
187. RUIZ-TORRES, CLAUDIO ADRIAN, ARAUJO-MARTÍNEZ, RENÉ FERNANDOMARTÍNEZ-CASTAÑÓN, GABRIEL ALEJANDRO et al. A cost-effective method to prepare size-controlled nanoscale zero-valent iron for nitrate reduction. *Environmental Engineering Research*, v. 24, n. 3, p. 463-473, 2018.
188. MULLIGAN, CATHERINE N., YONG, RAYMOND N. GIBBS, BERNARD F. et al. Metal Removal from Contaminated Soil and Sediments by the Biosurfactant Surfactin. *Environmental Science & Technology*, v. 33, n. 21, p. 3812-3820, 1999.
189. GUO, HANJUN, LUO, SHENGLIANCHEN, LIANG et al. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 22, p. 8599-8605, 2010.
190. KANG, CHANG-HO, KWON, YOON-JUNGSO, JAE-SEONG. Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. *Ecological Engineering*, v. 89, p. 64-69, 2016.
191. EIVAZIHOLLAGH, ALIREZA, SVANEDAL, IDAEDLUND, HÅKAN et al. On chelating surfactants: Molecular perspectives and application prospects. *Journal of Molecular Liquids*, v. 278, p. 688-705, 2019.
192. SUDHAKAR, M., DOBLE, MUKESHMURTHY, P. SRIYUTHA et al. Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 61, n. 3, p. 203-213, 2008.
193. BALASUBRAMANIAN, V., NATARAJAN, K. HEMAMBIKA, B. et al. High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. *Letters in Applied Microbiology*, p. 205-211, 2010.
194. YANG, JUN, YANG, YUWU, WEI-MIN et al. Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms. *Environmental Science & Technology*, v. 48, n. 23, p. 13776-13784, 2014.
195. SYRANIDOU, EVDOKIA, KARKANORACHAKI, KATERINAMOROTTI, FILIPPO et al. Biodegradation of weathered polystyrene films in seawater microcosms. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 2017.
196. JUN, HAE SANG, KIM, BONG OHKIM, YEON CHUL et al. Synthesis of copolyesters containing poly(ethylene terephthalate) and poly(ϵ -caprolactone) units and their susceptibility to *Pseudomonas* sp. lipase. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, v. 2, n. 1, p. 9-18, 1994.
197. MÜLLER, ROLF-JOACHIM, SCHRADER, HEDWIGPROFE, JÖRN et al. Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate): Rapid Hydrolyse using a Hydrolase from *T. fusca*. *Macromolecular Rapid Communications*, v. 26, n. 17, p. 1400-1405, 2005.
198. RONKVIST, ÅSA M., XIE, WENCHUNLU, WENHUA et al. Cutinase-Catalyzed Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*, v. 42, n. 14, p. 5128-5138, 2009.

199. VASILE, C. **Degradation and decomposition in Handbook of polyolefins synthesis and properties**. In: Vasile, C., Seymour, R. B. Marcel Dekker Inc, New York, 1993, p. 479-506.
200. WENTZEL, ALEXANDER, ELLINGSEN, TROND E.KOTLAR, HANS-KRISTIAN et al. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, n. 6, p. 1209-1221, 2007.
201. JI, YURUI, MAO, GUANNANWANG, YINGYING et al. Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, 2013.
202. HAN, LI, PENG, YANFENGZHANG, YUANGYUAN et al. Designing and Creating a Synthetic Omega Oxidation Pathway in *Saccharomyces cerevisiae* Enables Production of Medium-Chain α , ω -Dicarboxylic Acids. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 2017.
203. SCHEPS, DANIEL, HONDA MALCA, SUMIREHOFFMANN, HELEN et al. Regioselective ω -hydroxylation of medium-chain n-alkanes and primary alcohols by CYP153 enzymes from *Mycobacterium marinum* and *Polaromonas* sp. strain JS666. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 9, n. 19, p. 6727, 2011.
204. SCHEPS, DANIEL, HONDA MALCA, SUMIRERICTER, SVEN M. et al. Synthesis of ω -hydroxy dodecanoic acid based on an engineered CYP153A fusion construct. *Microbial Biotechnology*, p. n/a-n/a, 2013.
205. CRAFT, D. L., MADDURI, K. M. ESHOO, M. et al. Identification and Characterization of the CYP52 Family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, Important for the Conversion of Fatty Acids and Alkanes to ω -Dicarboxylic Acids. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 10, p. 5983-5991, 2003.
206. Alves da Silva, Juliana. **Caracterização de polióis industriais por MALDI-TOF/MS** Juliana Alves da Silva; orientador Leandro Gonçalves de Aguiar. -Lorena, 2015.
207. LISBÃO, A. S. Estrutura e propriedades dos polímeros. EduFScar, São Carlos, 2010 p.87-91.
208. VERTOMMEN, M.A.M.E., NIERSTRASZ, V.A. VEER, M. VAN DER et al. Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephthalate). *Journal of Biotechnology*, v. 120, n. 4, p. 376-386, 2005.
209. RONKVIST, ÅSA M., XIE, WENCHUNLU, WENHUA et al. Cutinase-Catalyzed Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*, v. 42, n. 14, p. 5128-5138, 2009.

7 Apêndices

Tabela apêndice 1. Lista de microrganismos isolados de um indivíduo da espécie *Podocarpus macrophyllus* ao longo das estações inverno, primavera, verão e outono.

LaBioMMi	Estação	Orgão	Identificação sugerida	Score
1131	Inverno	Folha	<i>Bacillus licheniformis</i> 992000432 LBK	2.061
1132	Inverno	Folha	<i>Staphylococcus warneri</i> CCM 2604 CCM	2.104
1133	Inverno	Folha	LaBioMMi 1133	3.000
1134	Inverno	Caule	LaBioMMi 1133	2.212
1135	Inverno	Caule	LaBioMMi 1135	3.000
1136	Inverno	Caule	<i>Bacillus thuringiensis</i> DSM 2046T DSM	1.729
1137	Inverno	Caule	LaBioMMi 1137 (<i>Bacillus pumilus</i>)	3.000
1138	Inverno	Caule	LaBioMMi 1133	2.783
1139	Inverno	Caule	LaBioMMi 1139	3.000
1140	Inverno	Caule	LaBioMMi 1133	2.617
1141	Inverno	Caule	<i>Bacillus licheniformis</i> 992000432 LBK	2.154
1142	Inverno	Caule	<i>Bacillus licheniformis</i> 992000432 LBK	2.005
1143	Inverno	Caule	LaBioMMi 1133	2.745
1144	Primavera	Folha	LaBioMMi 1139	1.715
1145	Primavera	Folha	LaBioMMi 1145	3.000
1146	Primavera	Caule	<i>Klesiella oxytoca</i> VA20879 ERL	2.039
1147	Primavera	Caule	<i>Klesiella oxytoca</i> VA20879 ERL	1.977
1148	Primavera	Caule	<i>Pantoea agglomerans</i> DSM 3493T DSM	1.944
1149	Primavera	Caule	LaBioMMi 1132	1.977
1150	Primavera	Caule	LaBioMMi 1132	2.505
1151	Primavera	Caule	LaBioMMi 1158	3.000
1152	Primavera	Caule	LaBioMMi 1195	2.159
1153	Primavera	Caule	<i>Enterobacter cloacae</i> MB11506 1 CHB	2.036
1154	Primavera	Caule	<i>Cupriavidus gilardii</i> DSM 17292T DSM	1.772
1155	Primavera	Caule	LaBioMMi 1132	2.666
1156	Primavera	Caule	LaBioMMi 1132	2.165
1157	Primavera	Caule	LaBioMMi 1137	1.757
1158	Primavera	Caule	LaBioMMi 1158	3.000
1159	Primavera	Caule	LaBioMMi 1158	1.792
1160	Primavera	Caule	<i>Rhizobium radiobacter</i> B177 UFL	1.711
1161	Primavera	Caule	<i>Rhizobium radiobacter</i> B177 UFL	1.738
1162	Primavera	Fruto	LaBioMMi 1160	2.724
1163	Primavera	Fruto	<i>Bacillus licheniformis</i> DSTM 13T DSM	1.778
1164	Primavera	Fruto	LaBioMMi 1158	2.485
1165	Primavera	Fruto	LaBioMMi 1164	3.000
1166	Verão	Folha	LaBioMMi 1166	3.000
1167	Verão	Folha	LaBioMMi 1166	2.613
1168	Verão	Folha	LaBioMMi 1166	2.302
1169	Verão	Folha	LaBioMMi 1166	2.182
1170	Verão	Folha	<i>Arthobacter castelli</i> DSM 16402T DSM	1.738
1171	Verão	Folha	LaBioMMi 1166	2.142

1172	Verão	Caule	LaBioMMi 1166	2.280
1173	Verão	Caule	LaBioMMi 1166	2.208
1174	Verão	Caule	LaBioMMi 1177	2.754
1175	Verão	Caule	<i>Ralstonia picketti</i> 21323 1CHB	1.926
1176	Verão	Caule	LaBioMMi 1177	2.652
1177	Verão	Caule	<i>Burkholderia stabilis</i> DSM 16586T DSM	1.727
1178	Verão	Caule	<i>Bacillus licheniformis</i> 992000432 LBK	1.827
1179	Verão	Caule	LaBioMMi 1132	1.819
1180	Verão	Caule	LaBioMMi 1165	2.571
1181	Verão	Caule	LaBioMMi 1165	2.214
1182	Verão	Caule	LaBioMMi 1137	2.298
1183	Verão	Caule	LaBioMMi 1175	2.122
1184	Verão	Caule	LaBioMMi 1155	1.764
1185	Verão	Caule	LaBioMMi 1174	1.850
1186	Verão	Caule	LaBioMMi 1137	2.390
1187	Verão	Caule	<i>Ralstonia picketti</i> 21323 1CHB	1.886
1188	Verão	Caule	LaBioMMi 1187	2.460
1189	Verão	Caule	LaBioMMi 1187	2.438
1190	Verão	Caule	LaBioMMi 1177	2.612
1191	Verão	Fruto	LaBioMMi 1137	2.390
1192	Verão	Fruto	LaBioMMi 1137	2.390
1193	Verão	Fruto	LaBioMMi 1193	3.000
1194	Verão	Fruto	LaBioMMi 1137	2.587
1195	Verão	Fruto	LaBioMMi 1137	2.415
1196	Outono	Caule	<i>Bacillus cereus</i> DSM 31T DSM	2.011
1197	Outono	Caule	<i>Bacillus cereus</i> 994000168 LBK	1.710
1198	Outono	Caule	<i>Pseudomonas monteillii</i> 041 W10 NFI	2.093
1199	Outono	Caule	<i>Pseudomonas fulva</i> 013 W30 NFI	1.780
1200	Outono	Caule	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 THL	1.746
1201	Outono	Caule	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 THL	1.857
1202	Outono	Caule	LaBioMMi 1180	2.303

Tabela apêndice 2. Microrganismos isolados em Araraquara e São Carlos nas estações de inverno e primavera.

ID	Estação	Cidade	Identificação sugerida	Score
1	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1202/ LaBioMMi 1180	2.644/2.628
2	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.505/2.363
3	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.657/2.572
4	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.542/2.445
5	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1178/ LaBioMMi 1131 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	2.390/2.093
6	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.494/2.350
7	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.525/2.384
8	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.556/2.333
9	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1137/ LaBioMMi 1195	2.451/2.436
10	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.577/2.451
11	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.565/2.459

12	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1198 (<i>Pseudomonas monteilii</i>)	2.020
13	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.533/2.264
14	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1202/ LaBioMMi 1180	2.378/2.363
15	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.551/2.192
16	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1180	2.622
17	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.600/2.416
18	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.574/2.432
19	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.580/2.354
20	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.584/2.399
21	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1178/ LaBioMMi 1131 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	2.310/2.149
22	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.552/2.372
23	Primavera	Araraquara	ARA3_7	
24	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1131 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	2.108
25	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.242/2.131
26	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.397/2.208
27	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.150/1.974
28	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.122/2.090
29	Primavera	Araraquara	LaBioMMi 1131 (<i>Bacillus licheniformis</i>)/ LaBioMMi 1141	2.114/1.831
30	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1194/ LaBioMMi 1137	2.444/2.226
31	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1202/ LaBioMMi 1180	2.165/2.066
32	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1202/ LaBioMMi 1180	2.574/2.462
33	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1202/ LaBioMMi 1180	2.123/2.039
34	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1163/ LaBioMMi 1141 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	2.144/2.084
35	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1153 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	2.021
36	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1163/ LaBioMMi 1131 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	2.110/2.033
37	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1194/ LaBioMMi 1137	2.447/2.329
38	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1202/ LaBioMMi 1180	2.120/2.076
39	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1202/ LaBioMMi 1180	2.562/2.269
40	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.580/2.517
41	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.251/2.153
42	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.435/2.101
43	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1202/ LaBioMMi 1180	2.427/1.955
44	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1142/ LaBioMMi 1131	2.192/2.052
45	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1202/ LaBioMMi 1180	2.578/2.134
46	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1202/ LaBioMMi 1180	2.176/2.078
47	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.149/2.129
48	Primavera	São Carlos	ES8	
49	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.587/2.563
50	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1202/ LaBioMMi 1180	2.658/2.476
51	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1141/ LaBioMMi 1131 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	2.283/2.191
52	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1192/ LaBioMMi 1137	2.312/2.190
53	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1194/ LaBioMMi 1137	2.151/2.123
54	Primavera	São Carlos	SC5	
55	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1192/ LaBioMMi 1137	2.278/2.113
56	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1192/ LaBioMMi 1137	2.638/2.471
57	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.407/2.223
58	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1163/ LaBioMMi 1131 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	2.321/2.177

59	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.205/2.085
60	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.600/2.502
61	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.276/2.030
62	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.373/2.259
63	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.373/2.260
64	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.391/2.153
65	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.445/2.126
66	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1202/ LaBioMMi 1180	2.662/2.615
67	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.324/2.104
68	Primavera	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.384/2.327
69	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.206/2.060
70	Inverno	Araraquara	ARA4_7	
71	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.513/2.342
72	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.139/1.947
73	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1192/ LaBioMMi 1137	2.146/2.130
74	Inverno	Araraquara	ARA4_5	
75	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1194/ LaBioMMi 1137	2.049/2.037
76	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1194/ LaBioMMi 1137	2.668/2.341
77	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.301/2.137
78	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1152/ LaBioMMi 1137	2.594/1.964
79	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.650/2.052
80	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1194/ LaBioMMi 1137	2.293/2.012
81	Inverno	Araraquara	ARA3_8	
82	Inverno	Araraquara	ARA3_7	
83	Inverno	Araraquara	ARA3_6	
84	Inverno	Araraquara	ARA3_5	
85	Inverno	Araraquara	ARA3_4	
86	Inverno	Araraquara	ARA3_3	
87	Inverno	Araraquara	ARA3_2	
88	Inverno	Araraquara	ARA3_1	
89	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.589/2.436
90	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.518/2.493
91	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.637/2.487
92	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.523/2.462
93	Inverno	Araraquara	ARA2_5	
94	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.461/2.340
95	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.448/2.402
96	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.554/2.336
97	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1137/LaBioMMi 1152	2.409/2.200
98	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.582/2.330
99	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.601/2.405
100	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.571/2.344
101	Inverno	Araraquara	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.559/2.415
102	Inverno	Araraquara	ARA3_9	
103	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.864
104	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.622
105	Inverno	São Carlos	U7	

106	Inverno	São Carlos	U6	
107	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1159/ LaBioMMi 1137	2.349/2.227
108	Inverno	São Carlos	U4	
109	Inverno	São Carlos	U3	
110	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.481/2.323
111	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.282
112	Inverno	São Carlos	U15	
113	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.592/2.515
114	Inverno	São Carlos	U13	
115	Inverno	São Carlos	U12	
116	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.420/2.189
117	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.700
118	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.432/2.410
119	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1193/ LaBioMMi 1137	2.422/2.432
120	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.430/2.224
121	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.534
122	Inverno	São Carlos	A14	
123	Inverno	São Carlos	A13	
124	Inverno	São Carlos	E9	
125	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.664
126	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.677
127	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.732
128	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.430/2.387
129	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1137/ LaBioMMi 1192	2.426/2.373
130	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1194/ LaBioMMi 1137	2.599/2.404
131	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.814
132	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.420
133	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.852
134	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.787
135	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1153 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	2.227
136	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1153 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	2.101
137	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1153 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	2.098
138	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.857
139	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1153 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	2.135
140	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1153 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	2.021
141	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.496
142	Inverno	São Carlos	A2	
143	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.839
144	Inverno	São Carlos	A11	
145	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1153 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	2.114
146	Inverno	São Carlos	A1	
147	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1153 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	2.864
148	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	3.000
149	Inverno	São Carlos	C11	
150	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.622/2.452
151	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.805
152	Inverno	São Carlos	C2	

153	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.814
154	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.858
155	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.788
156	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1180/ LaBioMMi 1202	2.468/2.279
157	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.812
158	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.803
159	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.788
160	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.216/2.196
161	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.257
162	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1195/ LaBioMMi 1137	2.541/2.378
163	Inverno	São Carlos	D4	
164	Inverno	São Carlos	LaBioMMi 1200/LaBioMMi 1201	2.422/2.300
165	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.753
166	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.829
167	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.800
168	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.75
169	Inverno	São Carlos	Unidentified microorganism_103	2.75

Tabela apêndice 3. Compostos voláteis do óleo essencial de *Podocarpus macrophyllus*.

Nº	Composto	Mol wt	Formula	Similaridade	RT	RI calculado
1	Alfa-pineno	136	C10H16	97	7,515	859
2	Beta-pineno	136	C10H16	95	8,696	886
3	1-Octen-3-ol	128	C8H16O	97	8,827	889
4	Beta-mirceno	136	C10H16	95	9,104	895
5	Alfa-felandreno	136	C10H16	85	9,485	1,003
6	Limoneno	136	C10H16	94	10,148	1,015
7	Beta-Ocimeno	136	C10H16	93	10,815	1,027
8	Gama-terpineno	136	C10H16	94	11,047	1,031
9	Alfa-Terpinoleno	136	C10H16	95	11,890	1,046
10	(+)-Canfora	152	C10H16	97	13,408	1,074
11	(-)-Mirtenol	152	C10H16O	82	14,967	1,202
12	Beta-Ciclocitral	152	C10H16O	91	15,541	1,214
13	1,1,4-trimetil-3,4,4,5,6,7-hexahidronaftalen-2-ona	192	C13H20O	82	16,936	1,242
14	2,5,5,8-tetrametil-3,4,4,5,6,8-hexahidrocrom-2eno	194	C13H22O	83	17,165	1,246
15	2,6,10,10-tetrametil-1-oxa-spiro[4.5]dec-6-eno	194	C13H22O	92	17,425	1,251
16	Elixeno	204	C15H24	95	18,103	1,265
18	Alfa-cubebeno	204	C15H24	97	18,647	1,276
19	Cloveno	204	C15H24	91	18,906	1,281
20	Copaeno	204	C15H24	96	19,310	1,289
21	2,4-Diisopropenil-1-metil-1-vinilciclohexano	204	C15H24	90	19,508	1,293
22	Beta-Elemeno	204	C15H24	95	19,659	1,296
23	3,3,7,11-tetrametiltriciclo[6.3.0.0(2,4)]undec-8-eno	204	C15H24	88	19,799	1,299
24	Cariofileno	204	C15H24	96	20,055	1,404
25	Cadineno	204	C15H24	86	20,125	1,406
26	Gama-gurjuneno	204	C15H24	84	20,238	1,408
27	Caryophyllene	204	C15H24	97	20,386	1,412

28	Gama-muuroleno	204	C15H24	91	20,560	1,416
29	Alfa-Panasinseno	204	C15H24	84	20,720	1,419
30	Aromadendreno	204	C15H24	93	20,813	1,421
31	Humuleno	204	C15H24	96	21,148	1,429
32	Alfa-Guaieno	204	C15H24	86	21,324	1,432
33	.Alfa.-Amorfenos	204	C15H24	94	21,638	1,439
34	Beta-Cubebeno	204	C15H24	93	21,765	1,442
35	Germacreno	204	C15H24	94	22,143	1,450
36	cis-(-)-2,4a,5,6,9-hexahidro-3,5,5,9-tetrametil(1H)benzociclohepteno	204	C15H24	80	22,345	1,455
37	(+)-Calareno	204	C15H24	89	22,492	1,458
38	Delta Cadineno	204	C15H24	92	22,674	1,462
39	4-Isopropil-1,6-dimetil-1,2,3,4,4a,7-hexahidronaftaleno	204	C15H24	96	22,885	1,467
40	1-Isopropil-4,7-dimetil-1,2,4,5,6,8-hexahidronaftaleno	204	C15H24	89	23,003	1,469
41	5,5,9-Trimetil-3-metileno-2,3,5,6,7,8,9,9-octahidro-1H-benzociclohepteno	204	C15H24	88	23,564	1,482
42	Gama-Gurjunepoxido	204	C15H24	81	23,685	1,484
43	Spathulenol	220	C15H24O	93	23,904	1,489
44	Globulol	222	C15H26O	85	24,032	1,492
45	Ledol	222	C15H26O	92	24,230	1,496
46	2-(4,8-Dimetil-2,3,4,4,5,6,7,8-octahidro-2-naftalenil)-2-propanol	222	C15H26O	85	24,454	1,601
47	Delta-Cadinol	222	C15H26O	83	24,953	1,608
48	Tau-Muurolol	222	C15H26O	91	25,221	1,611
49	Alfa-Cadinol	222	C15H26O	94	25,492	1,615
50	3,7,11-Trimetil-1-dodecanol	228	C15H32O	91	26,810	1,633
51	Hexahidrofarnesil acetona	268	C18H36O	95	29,047	1,663
52	Pimara-8,15-dieno	272	C20H32	88	30,464	1,682
53	Biformeno	272	C20H32	90	30,787	1,686
54	Epimanool	290	C20H34O	80	31,063	1,690
55	Pimara-7,15-dieno	272	C20H32	79	31,392	1,695
56	Isokaureno	272	C20H32	93	31,950	2,005
57	Sclareol	308	C20H36O ₂	83	32,282	2,015
58	Kaureno	272	C20H32	92	32,868	2,033
59	5-(1-Isopropenil-4,5-dimetilbicyclo[4.3.0]nonan-5-il)-3-metil-2-pentanol acetato	332	C22H36O ₂	87	33,801	2,061
60	Pimara-7,15-dien-3-ona	286	C20H30O	81	34,327	2,077

Tabela apêndice 4. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) no meio M1.

Nº	nome	WT	Formula	Similaridade	RT	RI experimental	RI tabelado
1	3-hidroxi-pentano-2-ona	102	C ₅ H ₁₀ O ₂	89	1.717	848	838
2	3-Penteno-2-ol	86	C ₅ H ₁₀ O	84	1.755	863	774
3	4,5-Dimetilimidazol	96	C ₅ H ₈ N ₂	78	1.872	906	927
4	o-Xileno	106	C ₈ H ₁₀	85	1.991	947	907
5	m-Xileno	106	C ₈ H ₁₀	88	2.029	959	896
6	Fenilacetaldéido	120	C ₈ H ₈ O	83	2.919	1050	1049
7	Nerolidol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	95	5.027	1570	1554

8	Farnesol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	86	5.269	1643	1678.7
9	6,11-Dimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol	208	C ₁₄ H ₂₄ O	90	5.568	1735	1634
10	Ciclohexadecanona	238	C ₁₆ H ₃₀ O	80	5.689	1774	1731
11	Isopropil miristato	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	92	5.848	1826	1812
12	8-Heptadecanol	256	C ₁₆ H ₃₄ O	81	5.863	1831	1873
13	Diisobutil ftalato	278	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	80	6.006	1879	1909
14	Dibutilftalato	278	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	89	6.273	1972	1967
15	2-Metilbutil laurato	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	85	6.999	2211	1814
15	Álcool Kopsinil	310	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O	80	7.733	2430	2510

Tabela apêndice 5. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) no meio M2.

Nº	nome	WT	Formula	Similaridade	RT	RI experimental	RI tabelado
1	Pentan-1-ol	88	C ₅ H ₁₂ O	85	1.589	803	766
2	3-Penten-2-ol	86	C ₅ H ₁₀ O	85	1.622	809	774
3	Pentan-2-ol	88	C ₅ H ₁₂ O	88	1.643	818	730
4	3-Metilbutan-2-ol	88	C ₅ H ₁₂ O	88	1.686	822	781
5	2-Metilpirazina	94	C ₅ H ₆ N ₂	90	1.818	874	849
6	3-metil-mercapto-propionaldeído	104	C ₄ H ₈ OS	94	2.209	916	916
7	2,5-Dimetilpirazina	108	C ₆ H ₈ N ₂	94	2.231	947	916
8	N-Butilidenobutilamina	127	C ₈ H ₁₇ N	85	2.388	1038	1032
9	Fenilacetaldeído	120	C ₈ H ₈ O	91	2.915	1050	1049

Tabela apêndice 6. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1137 (*Bacillus pumilus*) no meio M3.

Nº	Nome	WT	Formula	Similaridade	RT	RI experimental	RI tabelado
1	Pirrol	67	C ₄ H ₅ N	87	1.517	789	771
2	1-Metilsulfiniletileno	90	C ₃ H ₆ OS	78	1.526	790	781
3	2-Metil-5-hexanona	114	C ₇ H ₁₄ O	114	1.964	869	857
4	Etilbenzeno	106	C ₈ H ₁₀	80	1.983	872	864
5	O-Xileno	106	C ₈ H ₁₀	86	2.023	879	888
6	Heptan-2-ona	114	C ₇ H ₁₄ O	87	2.131	896	889
7	6-Metilheptan-2-ona	128	C ₈ H ₁₆ O	95	2.448	958	957
8	5-metilheptan-2-ona	128	C ₈ H ₁₆ O	86	2.503	968	965
9	1,3-Dimetiltrissulfeto	126	C ₂ H ₆ S ₃	78	2.526	972	972

10	Fenilacetaldéido	120	C ₈ H ₈ O	91	2.908	1048	1049
11	2-Hexadecanona	282	C ₁₉ H ₃₈ O	81	5.618	1751	1778
12	2-Hexadecanol	284	C ₁₉ H ₄₀ O	82	5.649	1761	1774
13	Monohexil ftalato	250	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	78	7.714	2007	2027

Tabela apêndice 7. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1141 (*Bacillus licheniformis*) no meio M1.

10	Nome	WT	Formula	Similaridade	RT	RI experimental	RI tabelado
1	N,N-Dimetilbutanamida	115	C ₆ H ₁₃ NO	80	1.766	833	819
2	2-Furaldeído	96	C ₅ H ₄ O ₂	84	1.862	851	835
3	1-etenilciclohex-1-eno	106	C ₈ H ₁₀	75	1.989	873	862
4	Ciclooctatetraeno	104	C ₈ H ₈	90	2.132	896	894
5	3-metil-mercapto-propionaldeído	104	C ₄ H ₈ OS	90	2.212	912	916
6	Benzaldeído	106	C ₇ H ₆ O	79	2.497	967	961
7	Fenilacetaldéido	120	C ₈ H ₈ O	91	2.917	1050	1049
8	2,3-Dimetilnonano	156	C ₁₁ H ₂₄	87	3.067	1080	1051

Tabela apêndice 8. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1141 (*Bacillus licheniformis*) no meio M2.

Nº	Nome	WT	Formula	Similaridade	RT	RI experimental	RI tabelado
1	2-Pentanon-3-ol	102	C ₅ H ₁₀ O ₂	90	1.721	825	
2	3-Pentanon-2-ol	102	C ₅ H ₁₀ O ₂	88	1.756	831	821
3	1,3-Butanediol	90	C ₄ H ₁₀ O ₂	81	1.772	835	815
4	2-Metipirazina	94	C ₅ H ₆ N ₂	89	1.823	844	852
5	Metil 2-hidroxipentanoato	132	C ₆ H ₁₂ O ₃	81	1.992	874	894
6	1,2-Dimetilpropil etanoato	130	C ₇ H ₁₄ O ₂	88	2.148	899	850
7	2,5-Dimetilpirazina	108	C ₆ H ₈ N ₂	87	2.237	917	916
8	N-pentilideno]-1-butanamina	141	C ₉ H ₁₉ N	84	2.387	947	1032
9	4-propilheptano	142	C ₁₀ H ₂₂	86	2.61	987	945
10	N-Isopentil-3-metil-1-butanamina	157	C ₁₀ H ₂₃ N	89	2.755	1016	1046
11	3-metil-N-[(E)-3-metilbutiliden]-1-butanamina	155	C ₁₀ H ₂₁ N	86	2.904	1047	1047
12	2-tridecanona	198	C ₁₃ H ₂₆ O	84	5.002	1563	1527
13	2-Hexadecanona	240	C ₁₆ H ₃₂ O	89	5.664	1766	1800
14	Hexahidrofarnesil acetona	298	C ₁₈ H ₃₆ O	86	5.689	1774	1754

Tabela apêndice 9. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1141 (*Bacillus licheniformis*) no meio M3.

Nº	Nome	WT	Formula	Similaridade	RT	RI experimental	RI tabelado
1	1-Metilsulfinitileno	90	C ₃ H ₆ OS	81	1.525	790	781
2	Tolueno	92	C ₇ H ₈	72	1.559	795	787
3	Dihidro-2-metil-3-furanona	100	C ₅ H ₈ O ₂	83	1.609	802	805
4	5-Metil-5-hexen-2-ol	114	C ₇ H ₁₄ O	79	1.97	870	847
5	Etilbenzeno	106	C ₈ H ₁₀	85	1.984	872	864
6	O-Xileno	106	C ₈ H ₁₀	87	2.022	879	888
7	3-metil-mercapto-propionaldeído	104	C ₄ H ₈ OS	92	2.198	909	909
8	2,5-Dimetilpirazina	108	C ₆ H ₈ N ₂	93	2.221	914	912
9	1,2-Ciclopentanediol	102	C ₅ H ₁₀ O ₂	83	2.374	944	976
10	6-metilheptan-2-ona	128	C ₈ H ₁₆ O	92	2.449	958	957
11	Fenilmetanamina	107	C ₇ H ₉ N	73	2.502	968	984
12	Fenilacetaldeído	120	C ₈ H ₈ O	91	2.902	1047	1049
13	Dodecano	170	C ₁₂ H ₂₆	94	3.107	1058	1100
14	2,6,7-Trimetildecano	184	C ₁₃ H ₂₈	93	3.137	1147	1121
15	5-Metiltridecano	198	C ₁₄ H ₃₀	86	4.367	1387	1355
16	5,9,13-Trimetil-4,8,12-tetradecatrienal	248	C ₁₇ H ₂₈ O	90	5.891	1840	1850
17	Monohexil ftalato	250	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	78	7.716	2020	2027

Tabela apêndice 10. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1202 (*Bacillus subtilis*) no meio M1.

Nº	Nome	WT	Formula	Similaridade	RT	RI experimental	RI tabelado
1	Cicloheptatrieno	92	C ₇ H ₈	93	1.57	796	786
2	3-Metilbut-2-en-1-ol	86	C ₅ H ₁₀ O	95	1.63	806	781
3	3-hidroxi-pentan-2-ona	102	C ₅ H ₁₀ O ₂	92	1.72	825	838
4	2,4,5-Trimetil-3-oxazolina	113	C ₆ H ₁₁ NO	84	1.76	833	819
5	Metilpirazina	94	C ₅ H ₆ N ₂	97	1.82	843	852
6	2,4,5-Trimetil-1,3-oxazol	111	C ₆ H ₉ NO	91	1.94	865	848
7	2,5-Dimetilpirazina	108	C ₆ H ₈ N ₂	92	2.23	915	916
8	2,3-Dimetilpirazina	109	C ₆ H ₈ N ₃	95	2.27	923	922
9	2-Metiltetrahidrotiofen-3-ona	116	C ₅ H ₈ OS	90	2.63	991	947
10	2,3,5-Trimetilpirazina	122	C ₇ H ₁₀ N ₂	95	2.70	1004	999
11	4-Metildecano	156	C ₁₁ H ₂₄	79	3.07	1080	1060
12	2,3,5,6-Tetrametilpirazina	136	C ₈ H ₁₂ N ₂	85	3.12	1090	1085
13	2-Nonenal	154	C ₉ H ₁₆ O	82	3.33	1136	1162

14	Nonan-1-ol	158	C ₉ H ₂₀ O	92	3.34	1140	1186
15	alfa-Bergamoteno	204	C ₁₅ H ₂₄	85	4.54	1433	1434
16	alfa-Zingibereno	204	C ₁₅ H ₂₄	94	4.80	1503	1495
17	beta-Sesquifelandreno	205	C ₁₅ H ₂₅	94	4.90	1535	1525
18	Nerolidol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	93	5.02	1570	1554
19	alfa-Bisabolol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	85	5.21	1624	1683
20	2,6-Farnesol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	85	5.27	1641	1695
21	Epoxicariofileno	220	C ₁₅ H ₂₄ O	83	5.35	1666	1613
22	Bulsenol	220	C ₁₅ H ₂₆ O	76	5.36	1669	1666
23	Cedr-8(15)-en-9-ol	220	C ₁₅ H ₂₆ O	75	5.37	1673	1644
24	Óxido de alfa-Bisabolol	220	C ₁₅ H ₂₆ O	76	5.46	1700	1707
25	2-Metil-5-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)pentana-2,3-diol	240	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	76	5.53	1714	1766
26	Dodecilociclohexan-2-one	266	C ₁₈ H ₃₄ O	80	5.73	1785	2045
27	Heptadecan-8-ol	256	C ₁₇ H ₃₆ O	76	5.86	1830	1873
29	2-(4-Nitrobutiril)cyclooctanona	241	C ₁₂ H ₁₉ NO ₄	74	6.11	1915	2008
30	Hexadeca-7-11-dienil acetato	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	85	6.26	1966	1944

Tabela apêndice 11. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1202 (*Bacillus subtilis*) no meio M2.

Nº	Nome	WT	Formula	Similaridade	RT	RI experimental	RI tabelado
1	3-Metilpentan-2-ona	100	C ₆ H ₁₂ O	89	1.52	789	750
2	1-Metilsulfinitileno	90	C ₃ H ₆ OS	73	1.55	793	781
3	3-Metilbut-2-en-1-ol	86	C ₅ H ₁₀ O	95	1.62	805	781
4	3-Etilpentan-2-ol	116	C ₇ H ₁₆ O	85	1.66	812	815
5	3-Hidroxi-pentan-2-ona	102	C ₅ H ₁₀ O ₂	92	1.72	825	838
6	2-Sec-butoxi-butano	116	C ₇ H ₁₆ O	89	1.76	832	828
7	2-Metilpirazina	94	C ₅ H ₆ N ₂	96	1.82	844	849
8	1-Hepten-4-ol	114	C ₇ H ₁₄ O	82	1.99	873	869
9	2-Metilbutil acetato	130	C ₇ H ₁₄ O ₂	86	2.15	900	901
10	3-metil-mercapto-propionaldeído	104	C ₄ H ₈ OS	87	2.21	912	912
11	2,5-Dimetilpirazina	108	C ₆ H ₈ N ₂	92	2.23	916	916
12	N-[(e)-pentilidene]-1-butanamine	141	C ₉ H ₁₉ N	84	2.39	947	1032
13	2-Etil-3-pentiloxirano	142	C ₉ H ₁₈ O	80	2.47	961	968
14	2-Metiltetrahydrotiofen-3-ona	116	C ₅ H ₈ OS	91	2.61	987	973
15	Ácido Hexanóico	116	C ₆ H ₁₂ O ₂	79	2.63	991	973
16	2-Etil-3-metilpirazina	122	C ₇ H ₁₀ N ₂	82	2.69	1001	1001
17	Fenilacetaldéido	120	C ₈ H ₈ O	91	2.92	1050	1049
18	3,5-Dimetil-2-etilpirazina	136	C ₈ H ₁₂ N ₂	81	3.09	1084	1079
19	2-Feniletanol	122	C ₈ H ₁₀ O	83	3.26	1121	1110
20	beta-Farneseno	204	C ₁₅ H ₂₄	92	4.64	1461	1458

21	Nerolidol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	95	5.03	1570	1554
22	Farnesol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	93	5.55	1730	1734
23	5,9,13-Trimetil-4,8,12-tetradecatrienal	248	C ₁₇ H ₂₈ O	93	5.91	1846	1855
24	Isoamil laureato	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	93	7.00	1995	1846

Tabela apêndice 12. Compostos voláteis produzidos pelo isolado LaBioMMi 1202 (*Bacillus subtilis*) no meio M3.

Nº	nome	WT	Formula	Similaridade	RT	RI experimental	RI tabelado
1	3-Metilpentan-2-onae	100	C ₆ H ₁₂ O	95	1.505	787	759
2	2-Metiltioetanol	92	C ₃ H ₈ OS	85	1.544	793	813
3	Tolueno	92	C ₇ H ₈	88	1.569	796	787
4	5-Metilhexan-2-ona	114	C ₇ H ₁₄ O	96	1.966	869	865
5	Etilbenzeno	106	C ₈ H ₁₀	78	1.986	873	864.1
6	3-metil-mercaptopropionaldeído	104	C ₄ H ₈ OS	91	2.201	909	909
7	2,5-Dimetilpirazina	108	C ₆ H ₈ N ₂	93	2.218	913	912
8	2-Metilheptan-6-ona	128	C ₈ H ₁₆ O	94	2.447	958	957
9	5-Metilheptan-2-ona	128	C ₈ H ₁₆ O	77	2.484	965	965
10	Octan-2-ona	128	C ₈ H ₁₆ O	86	2.497	967	970
11	Fenilacetaldeído	120	C ₈ H ₈ O	89	2.902	1047	1049
12	Monoetil ftalato	250	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	78	7.715	1990	2027

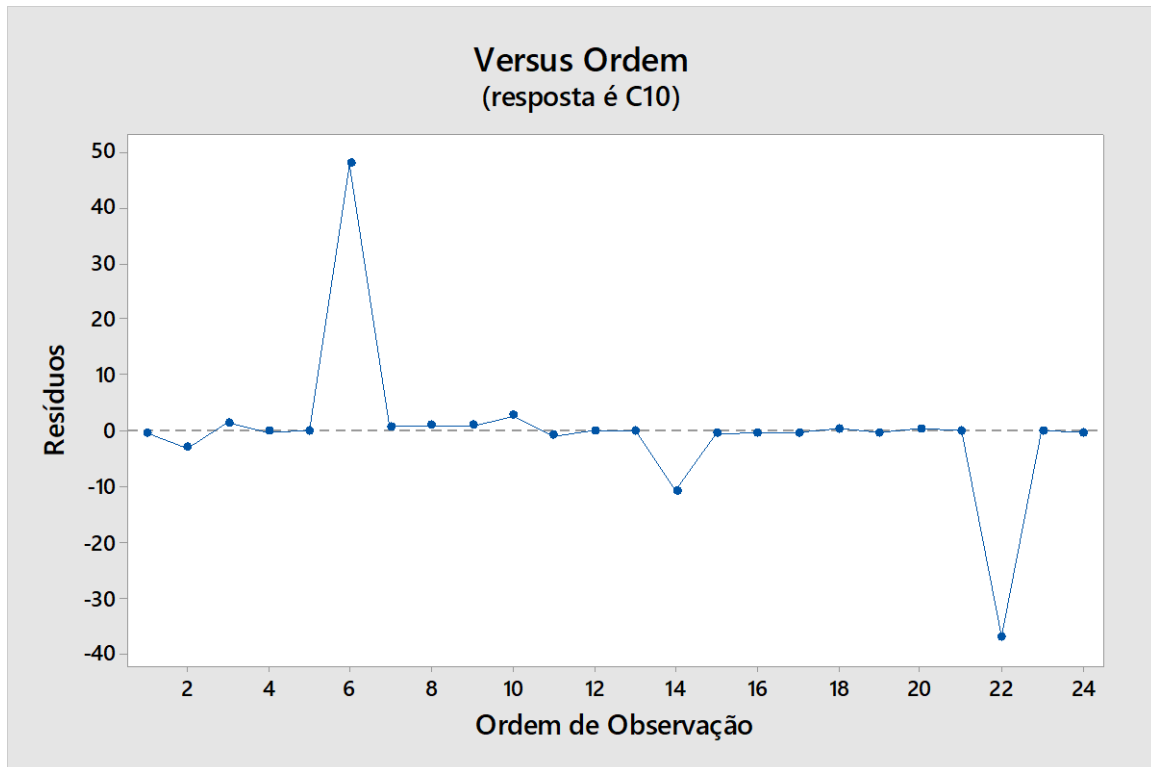


Figura apêndice 1. Gráfico de resíduos por ordem para o experimento de biossorção de Fe^{3+} .

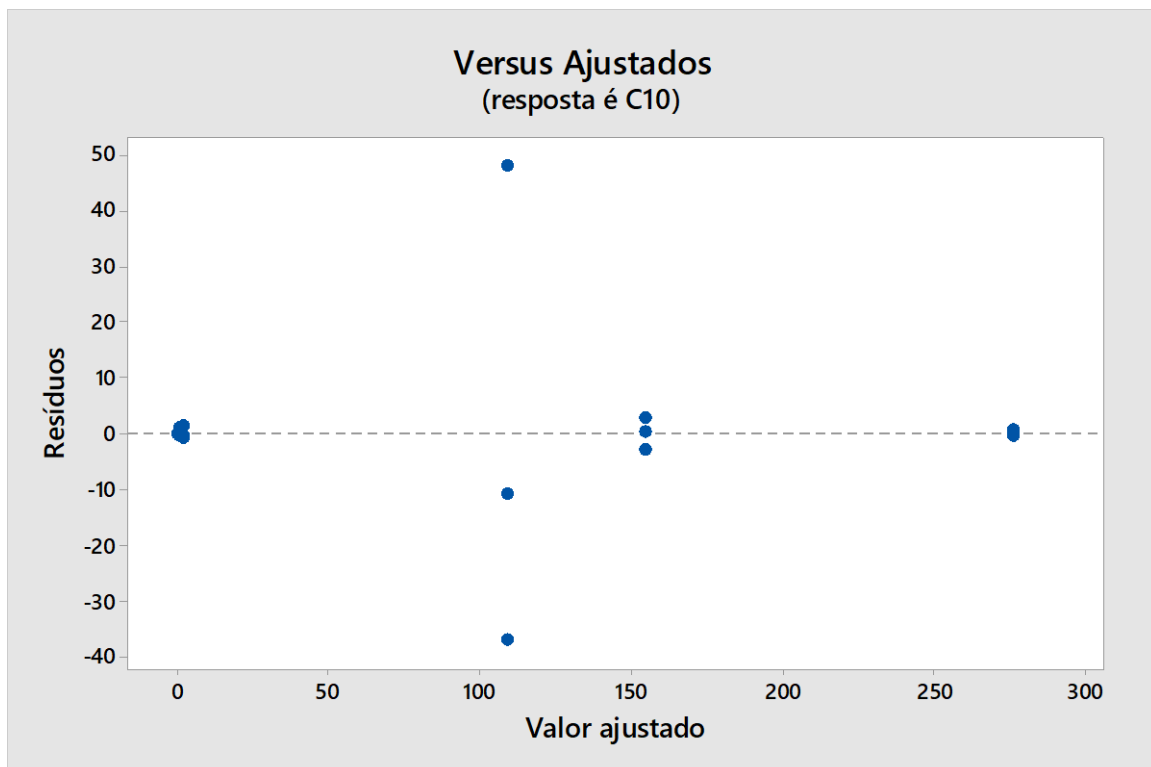


Figura apêndice 2. Gráfico de resíduos ajustados para o experimento de biossorção de Fe^{3+} .

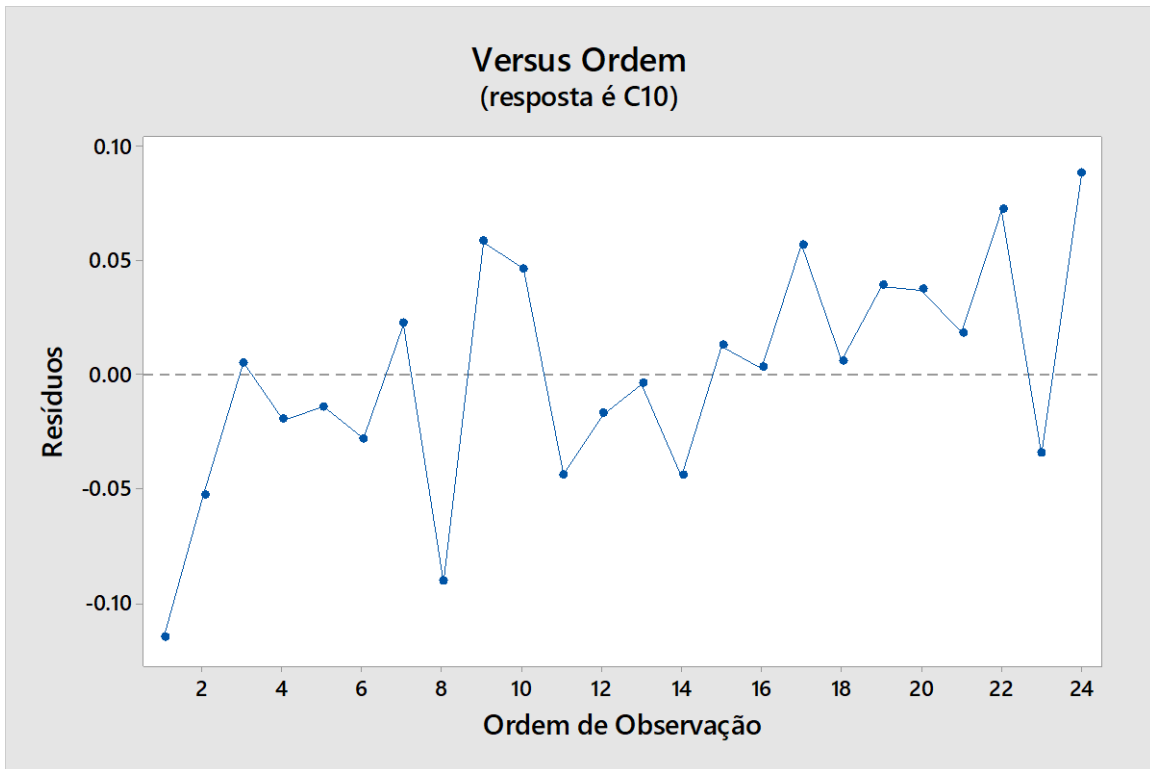


Figura apêndice 3. Gráfico de resíduos por ordem para o experimento de biossorção de Cu^{2+} .

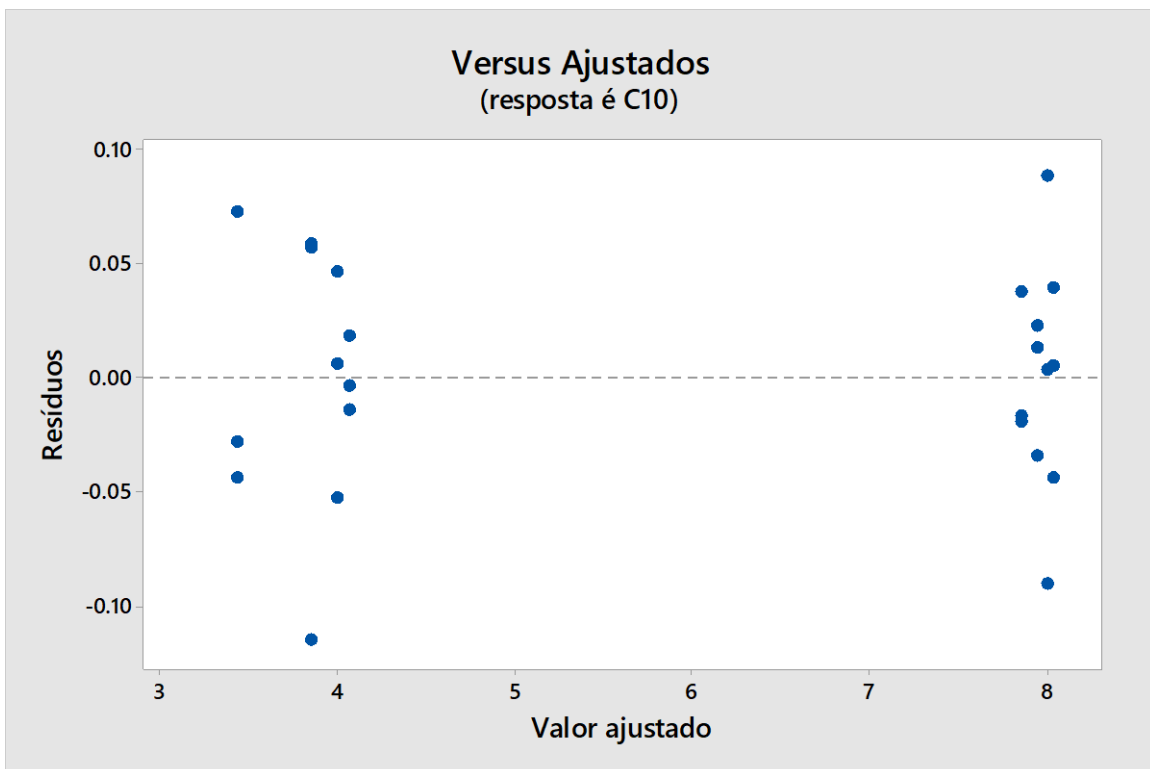


Figura apêndice 4. Gráfico de resíduos ajustados para o experimento de biossorção de Cu^{2+} .

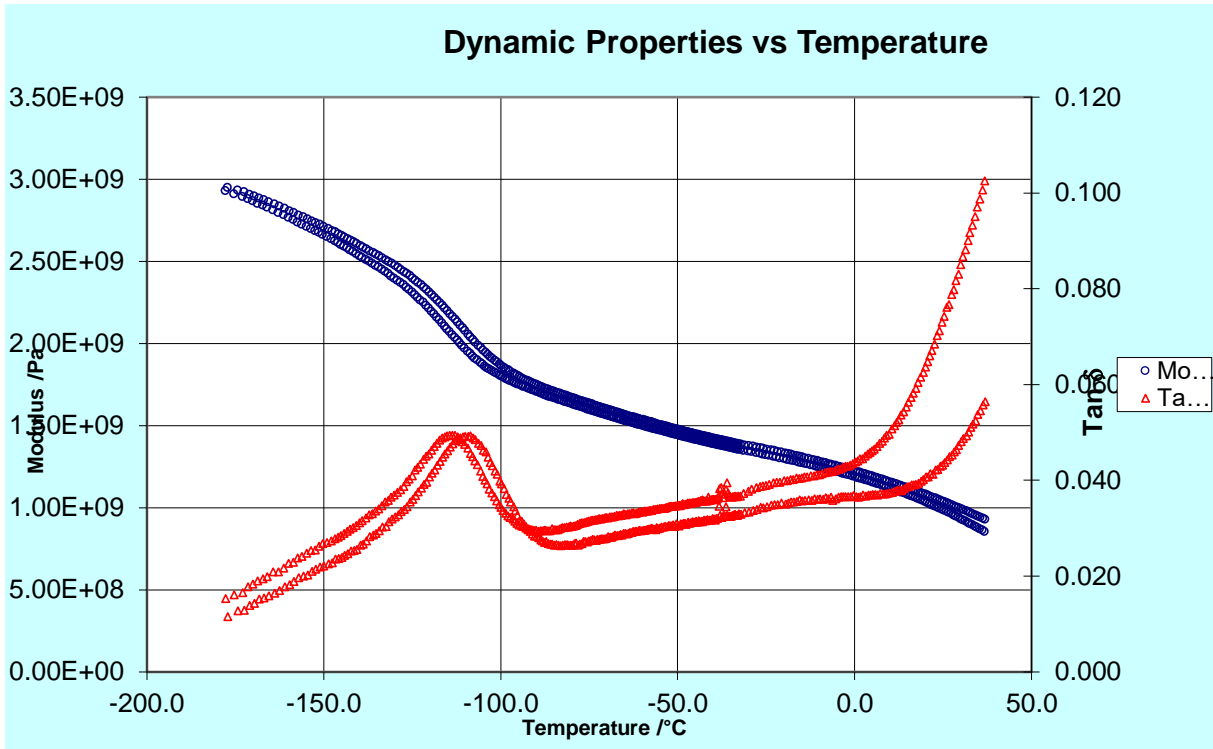


Figura apêndice 5. Análise dinâmico mecânica PEAD controle.

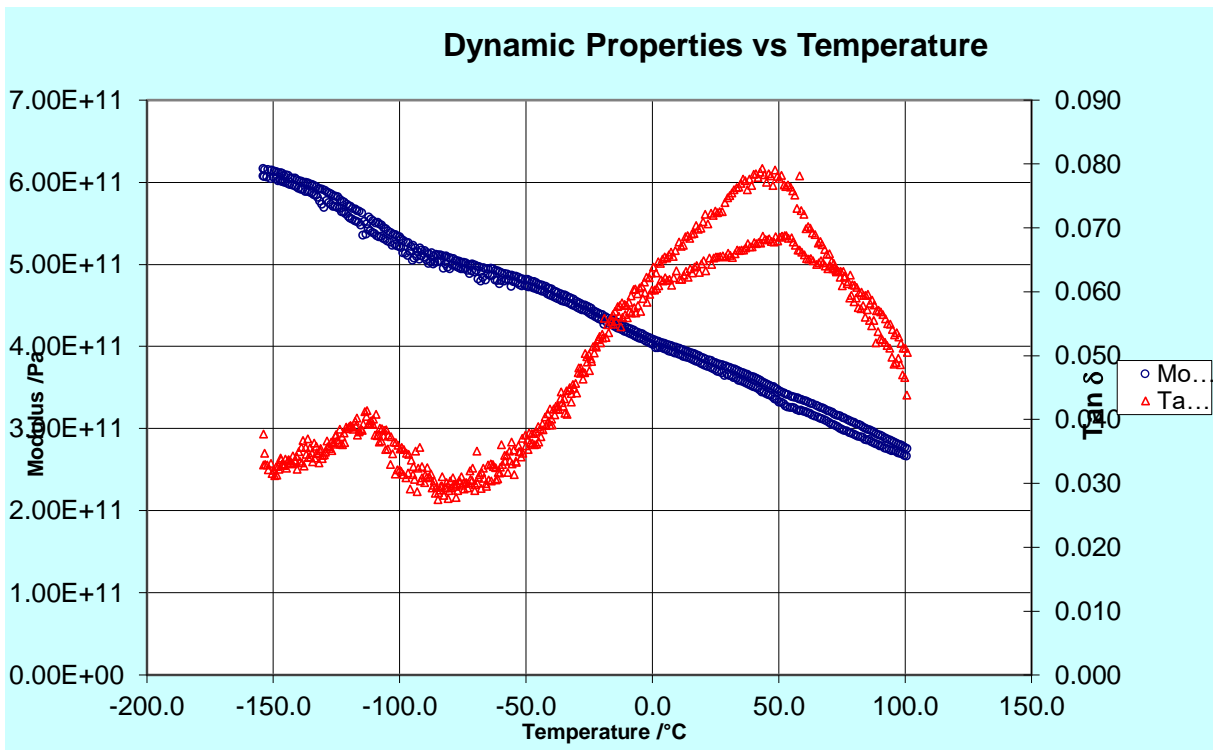


Figura apêndice 6. Análise dinâmico mecânica PEAD 30 dias.

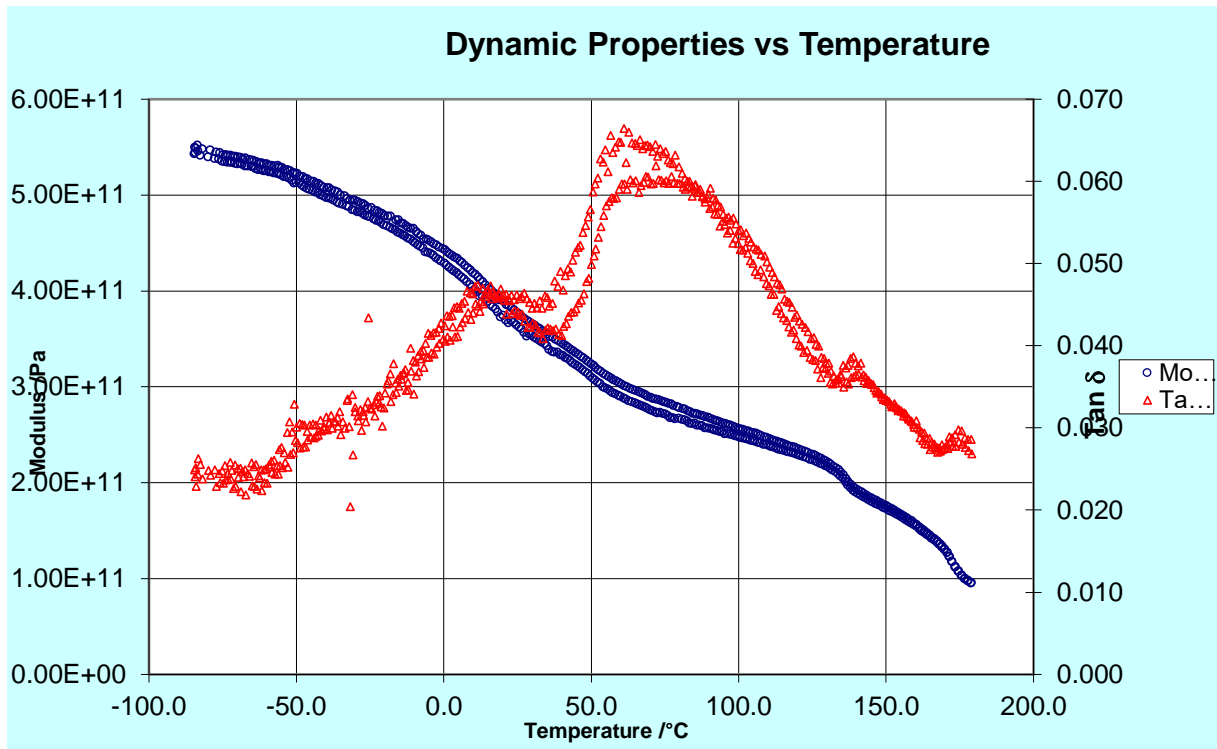


Figura apêndice 7. Análise dinâmico mecânica PP controle.

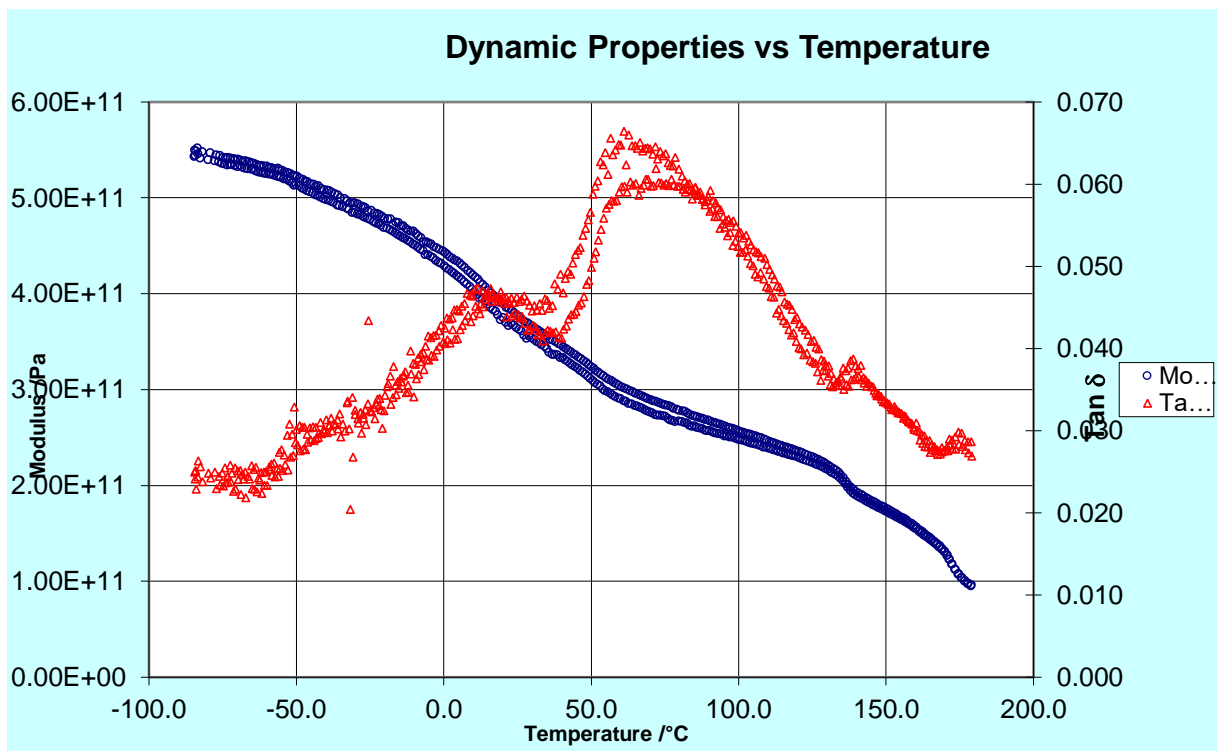


Figura apêndice 8. Análise dinâmico mecânica PP 30 dias.

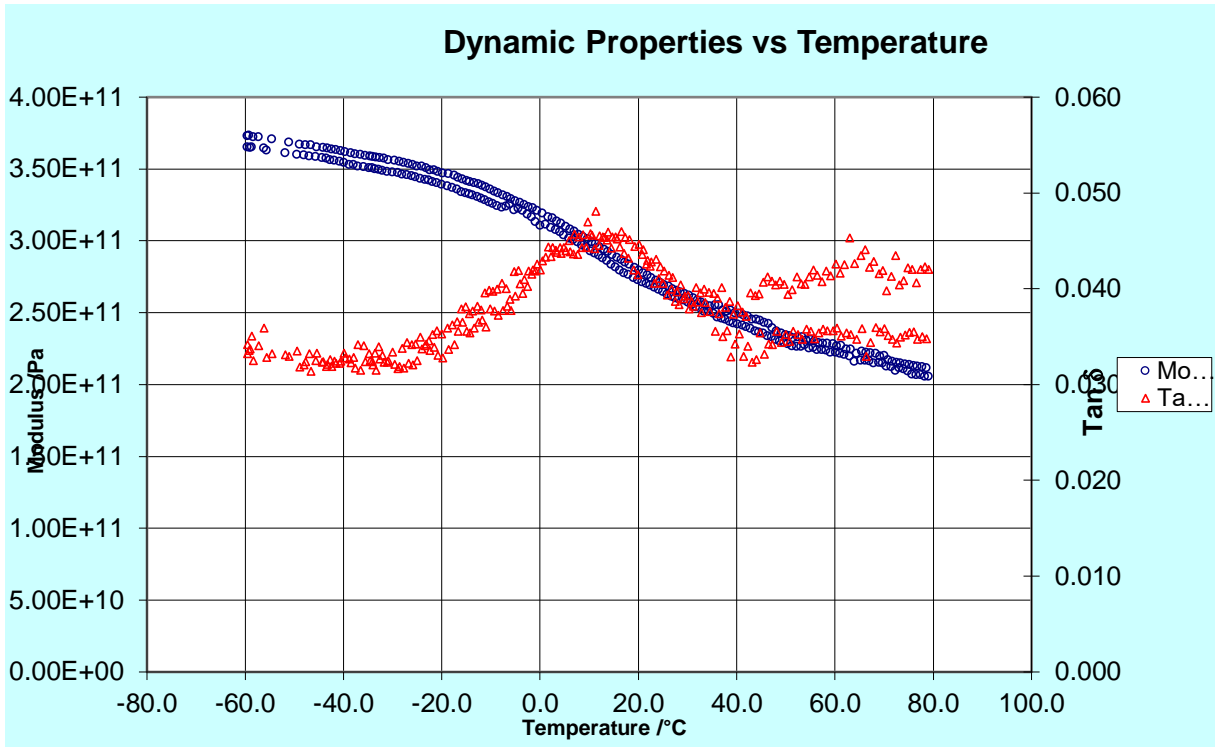


Figura apêndice 9. Análise dinâmico mecânica PP 60 dias.

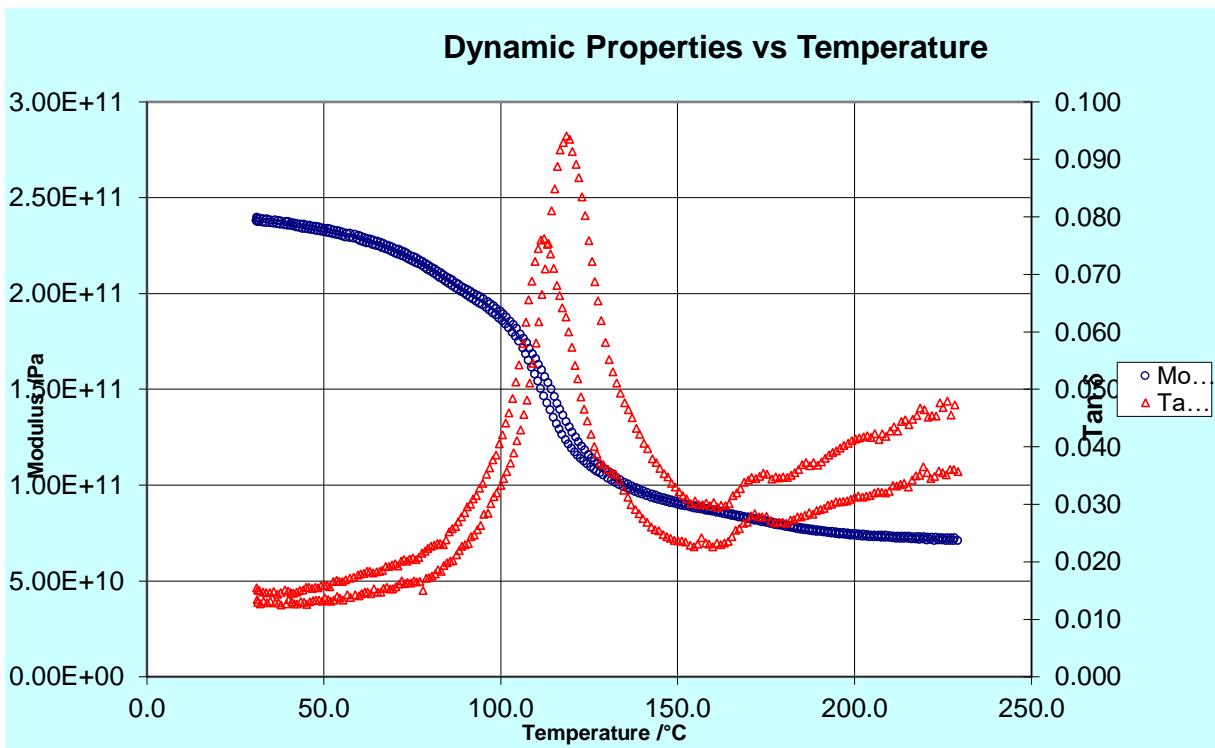


Figura apêndice 10. Análise dinâmico mecânica PS controle.

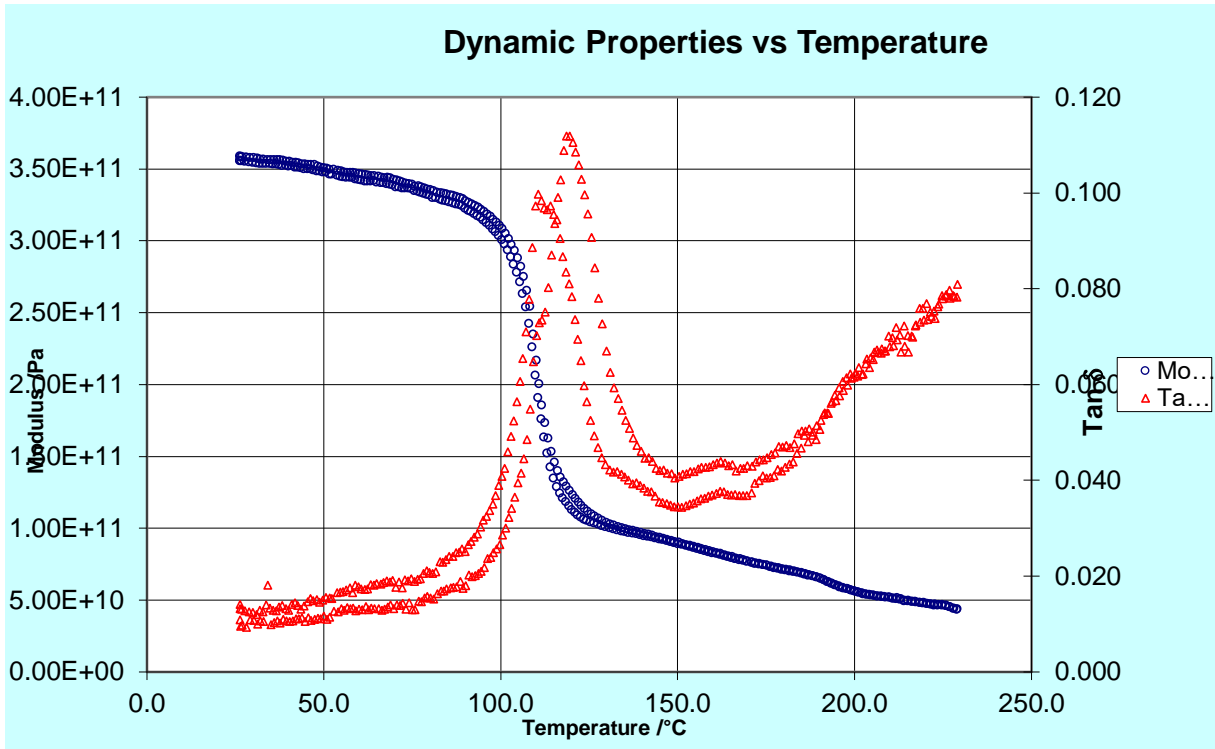


Figura apêndice 11. Análise dinâmico mecânica PS 30 dias.

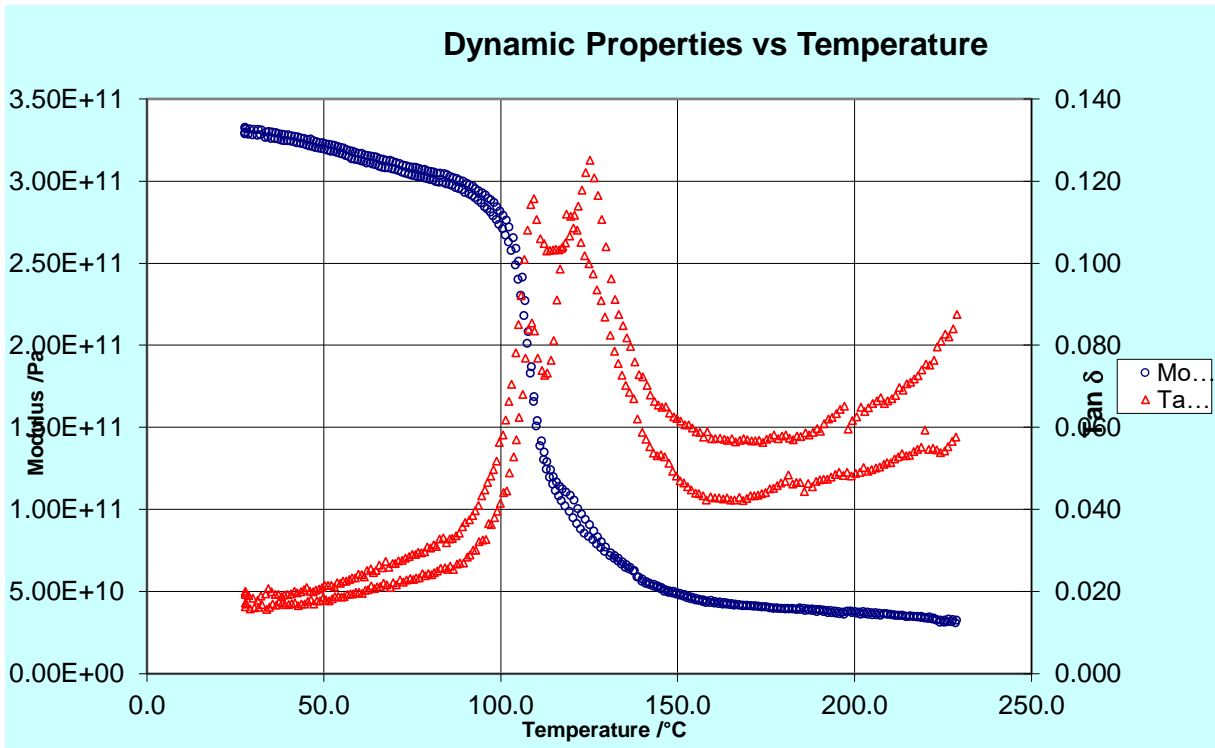


Figura apêndice 12. Análise dinâmico mecânica PS 60 dias.

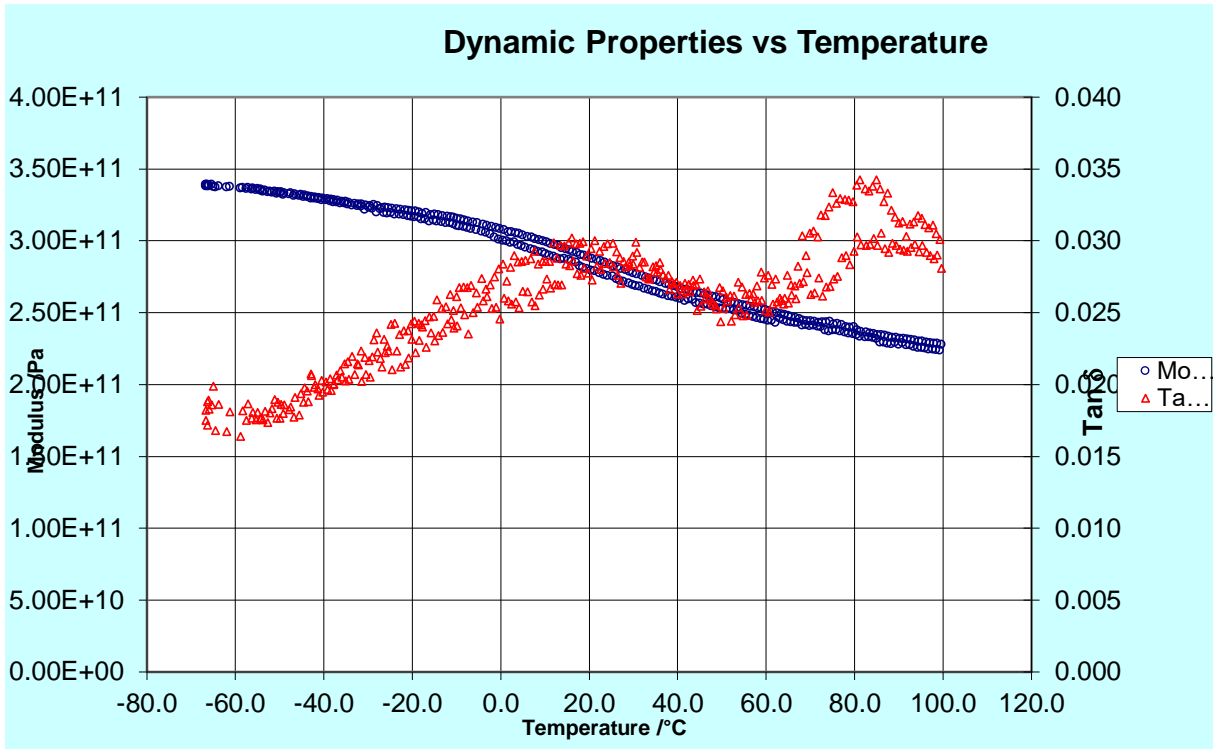


Figura apêndice 13. Análise dinâmico mecânica PA-11 controle.

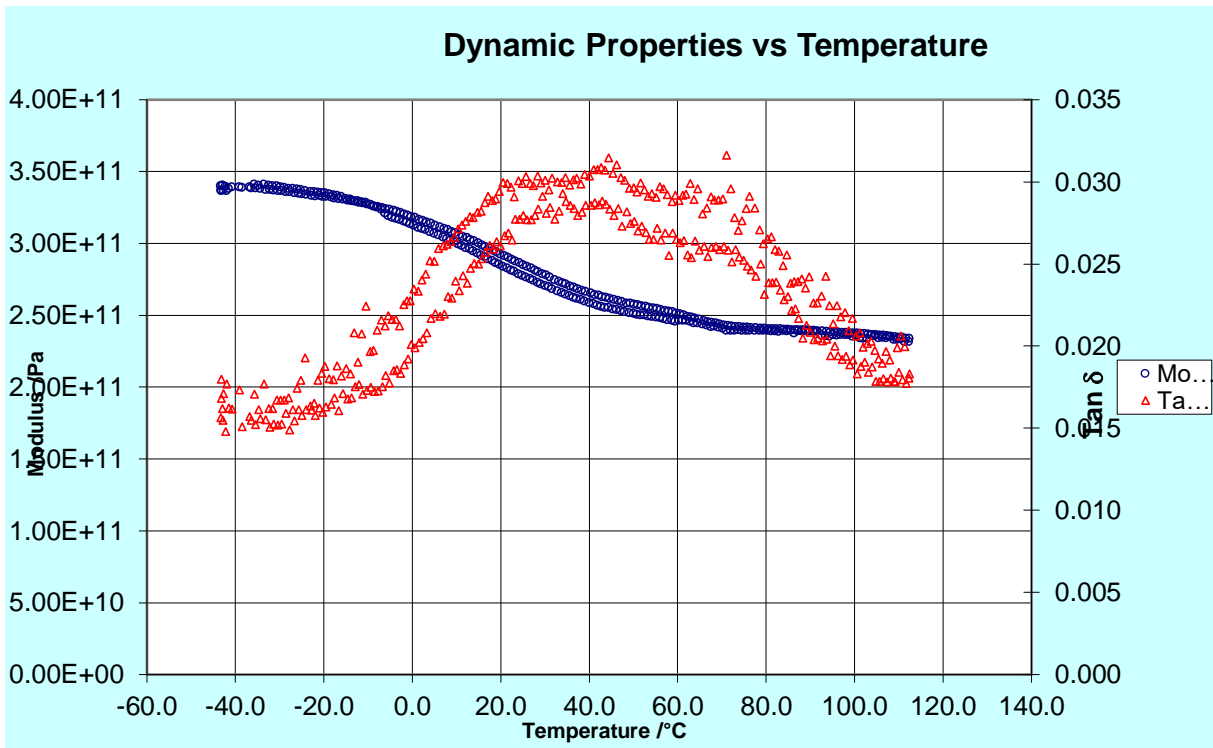


Figura apêndice 14. Análise dinâmico mecânica PA-11 30 dias.

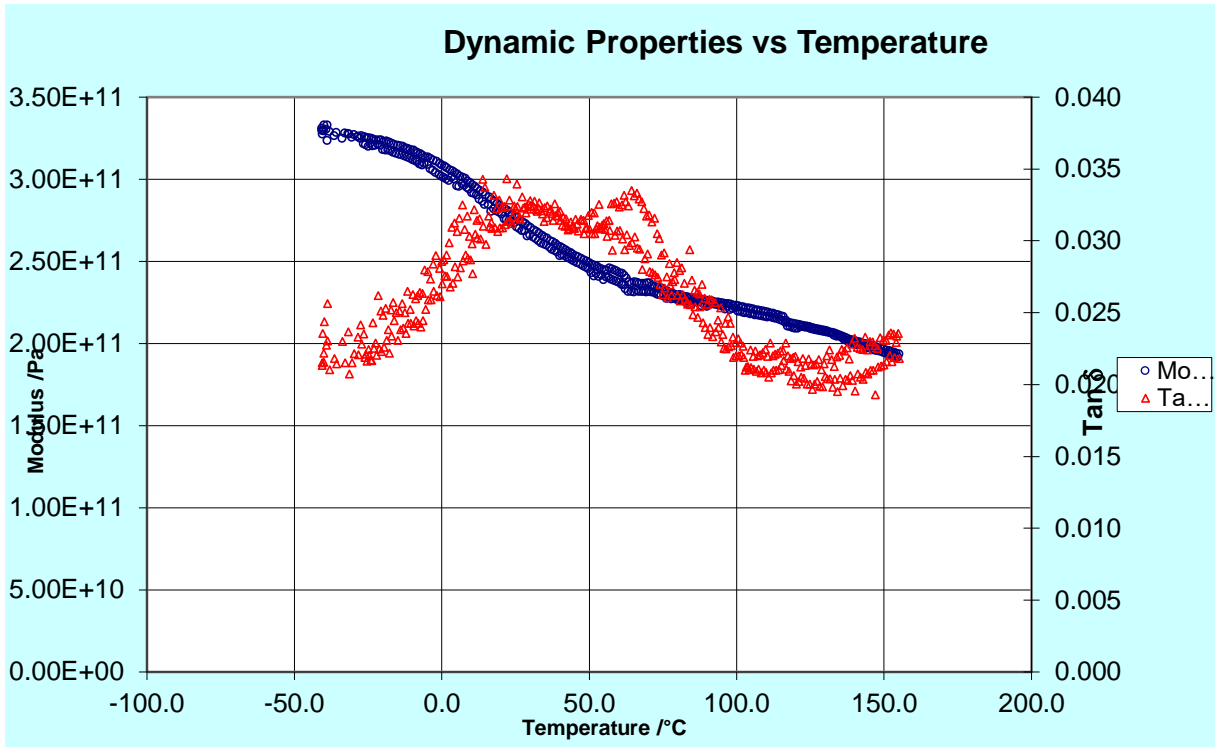


Figura apêndice 15. Análise dinâmico mecânica PA-11 60 dias.

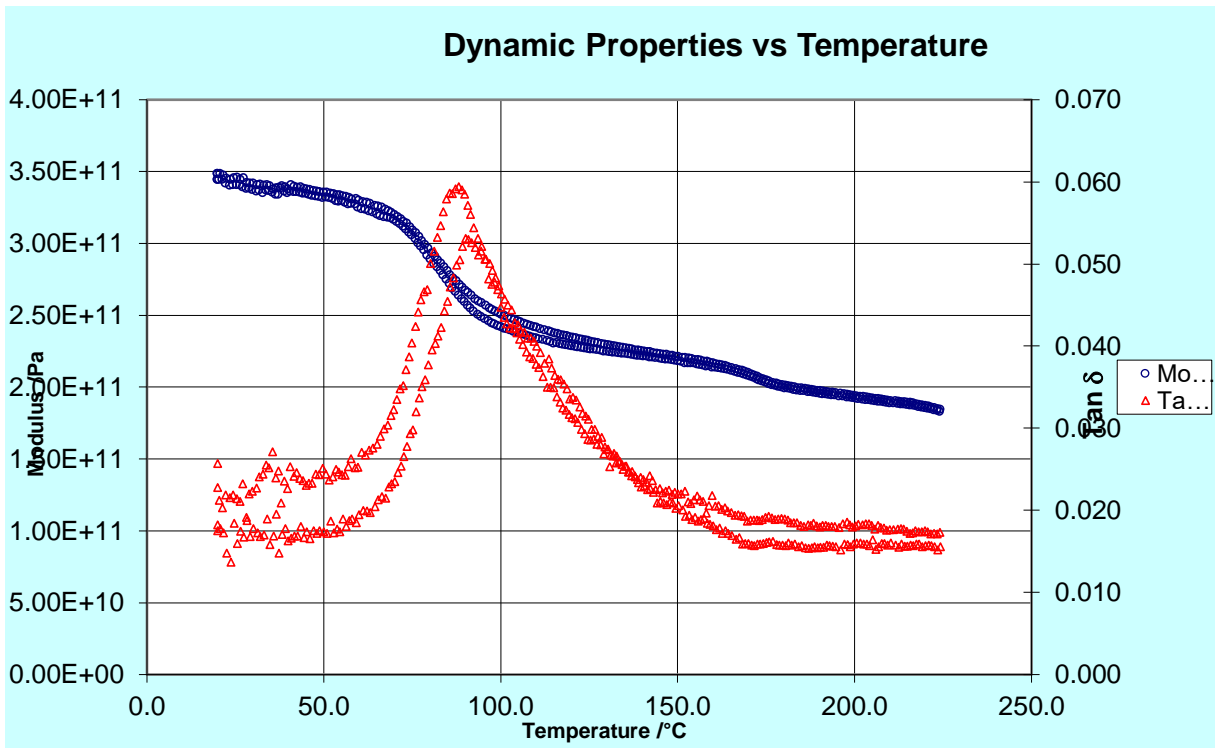


Figura apêndice 16. Análise dinâmico mecânica PET controle.

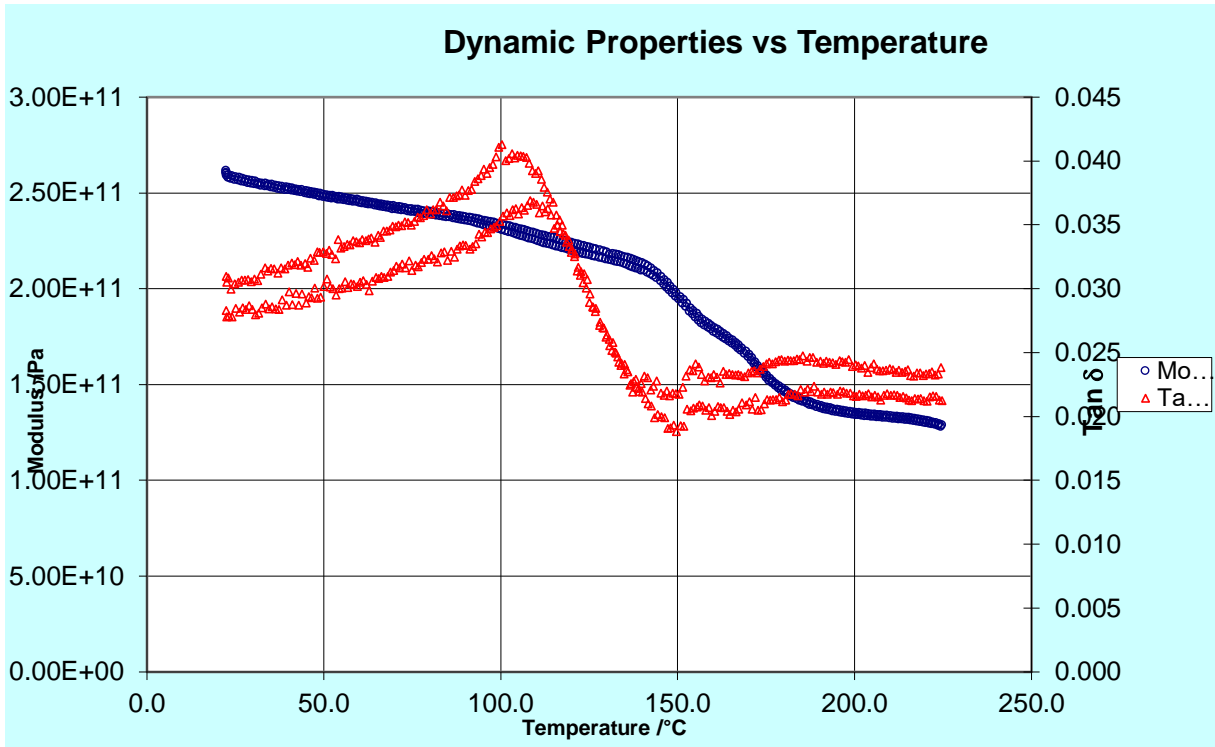


Figura apêndice 17. Análise dinâmico mecânica PET 30 dias.

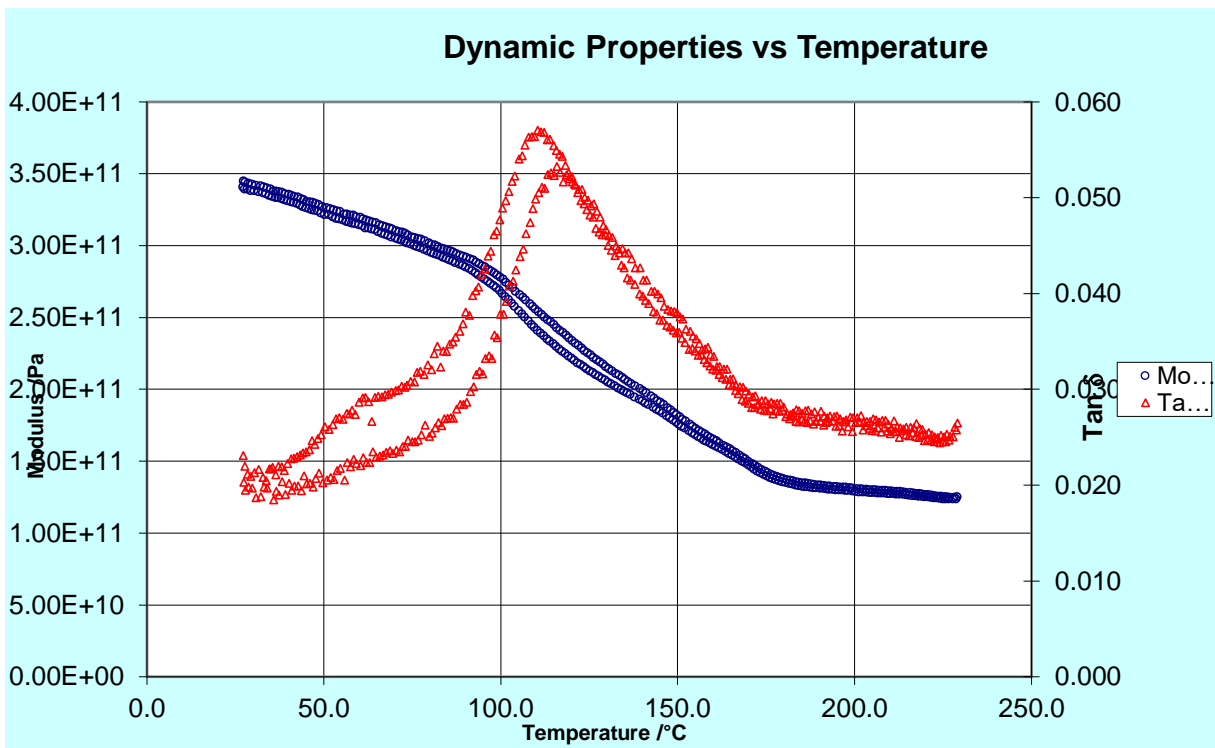


Figura apêndice 18. Análise dinâmico mecânica PA-11 60 dias.

Sample: 20181120_C1_DSC
Size: 5.0020 mg

DSC

File: E:\dsc\20181120_C1_DSC.txt
Operator: TA
Run Date: 20-Nov-2018 11:58
Instrument: DSC Q200 V24.11 Build 124

Comment: 50 mL/min - N2 - 10 °C/min 60 a 190 °C

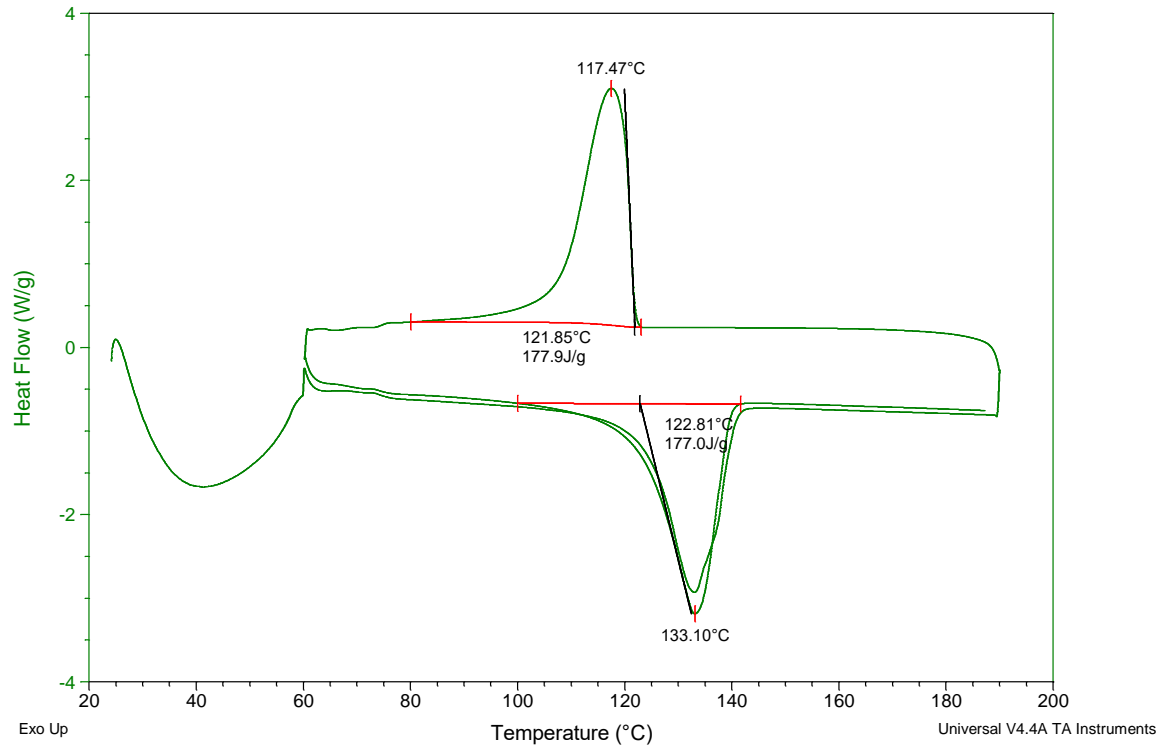


Figura apêndice 19. DSC PEAD controle.

Sample: 20181121_C2_DSC
Size: 5.0030 mg

DSC

File: E:\dsc\20181121_C2_DSC.txt
Operator: TA
Run Date: 21-Nov-2018 15:57
Instrument: DSC Q200 V24.11 Build 124

Comment: 50 mL/min - N2 - 10 °C/min 60 a 190 °C

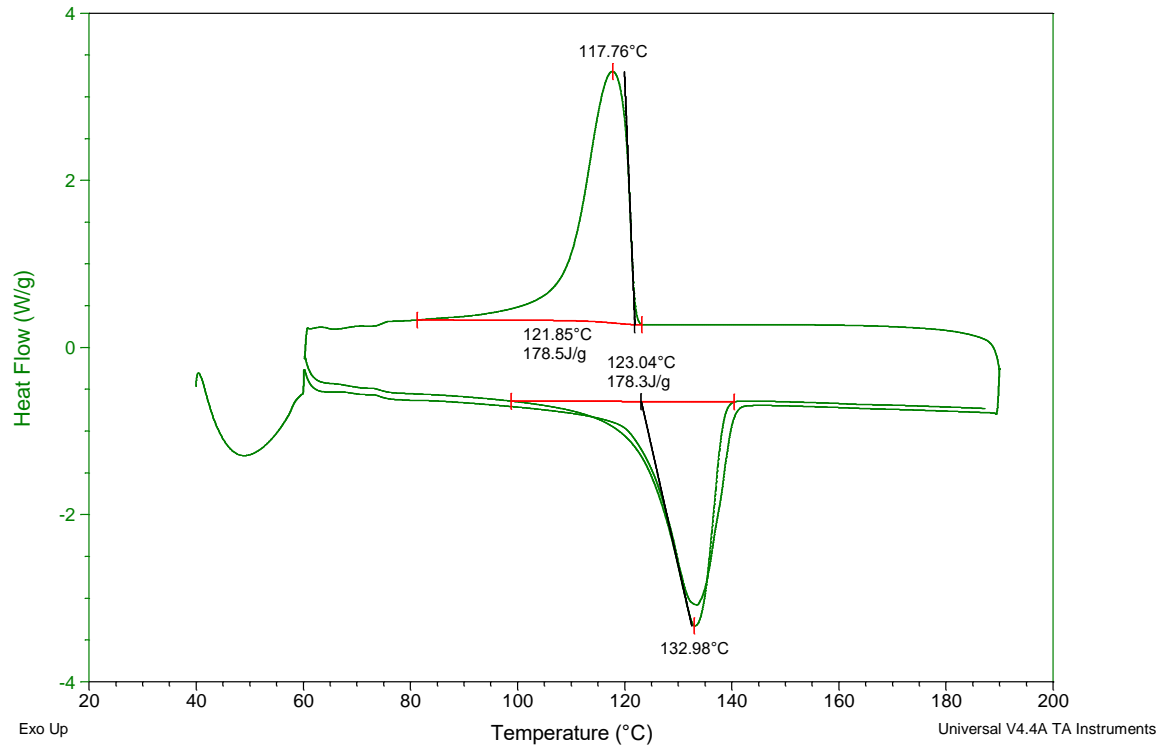


Figura apêndice 20. DSC PEAD 30 dias.

Sample: 20181121_C3_DSC
Size: 4.9980 mg

DSC

File: E:\dsc\20181121_C3_DSC.txt
Operator: TA
Run Date: 21-Nov-2018 17:27
Instrument: DSC Q200 V24.11 Build 124

Comment: 50 mL/min - N2 - 10 °C/min 60 a 190 °C

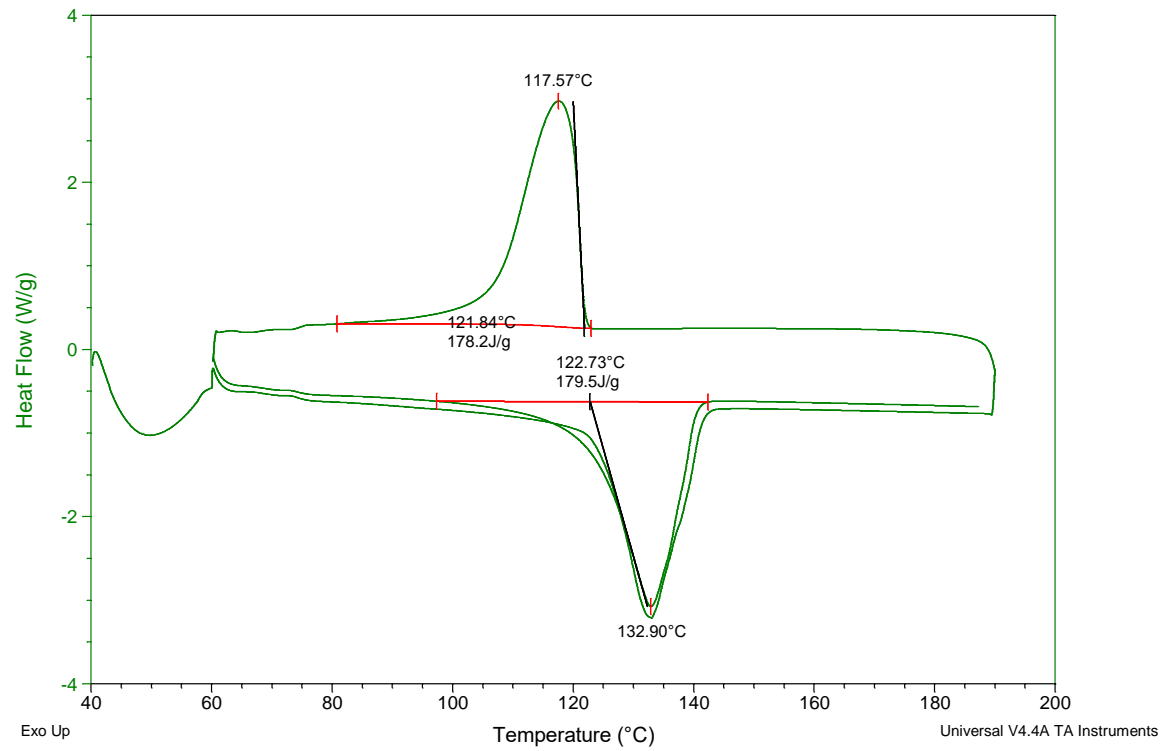


Figura apêndice 21. DSC PEAD 60 dias.

Sample: 20181121_C4_DSC
Size: 5.0020 mg

DSC

File: E:\dsc\20181121_C4_DSC.txt
Operator: TA
Run Date: 21-Nov-2018 18:35
Instrument: DSC Q200 V24.11 Build 124

Comment: 50 mL/min - N2 - 10 °C/min 60 a 190 °C

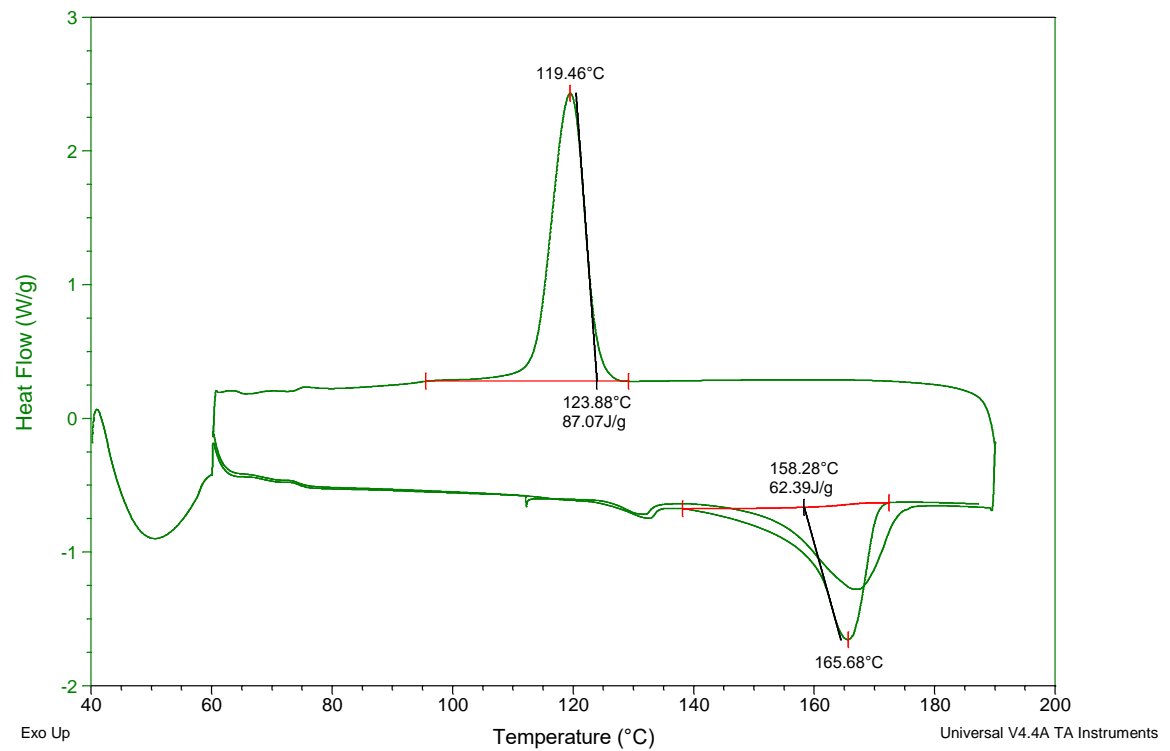


Figura apêndice 22. DSC PP controle.

Sample: 20181122_C5_DSC
Size: 5.0050 mg

DSC

File: E:\dsc\20181122_C5_DSC.txt
Operator: TA
Run Date: 22-Nov-2018 09:29
Instrument: DSC Q200 V24.11 Build 124

Comment: 50 mL/min - N2 - 10 °C/min 60 a 190 °C

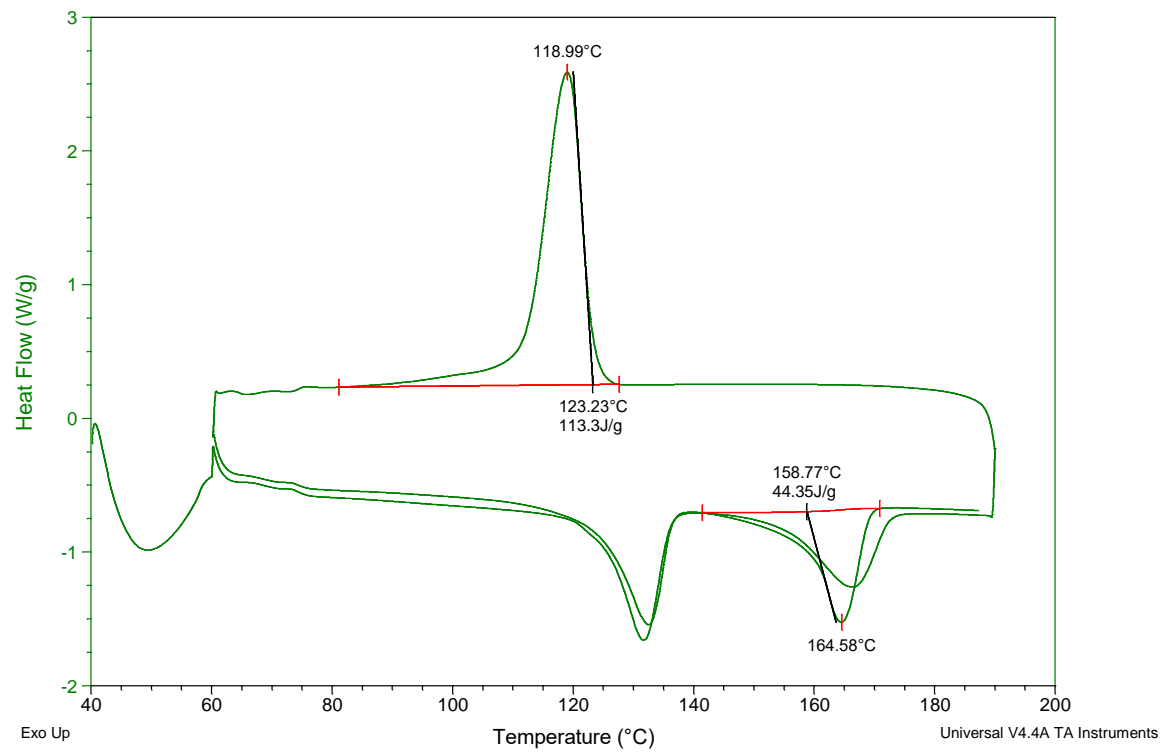


Figura apêndice 23. DSC PP 30 dias.

Sample: 20181122_C6_DSC
Size: 5.0080 mg

DSC

File: E:\dsc\20181122_C6_DSC.txt
Operator: TA
Run Date: 22-Nov-2018 13:33
Instrument: DSC Q200 V24.11 Build 124

Comment: 50 mL/min - N2 - 10 °C/min 60 a 190 °C

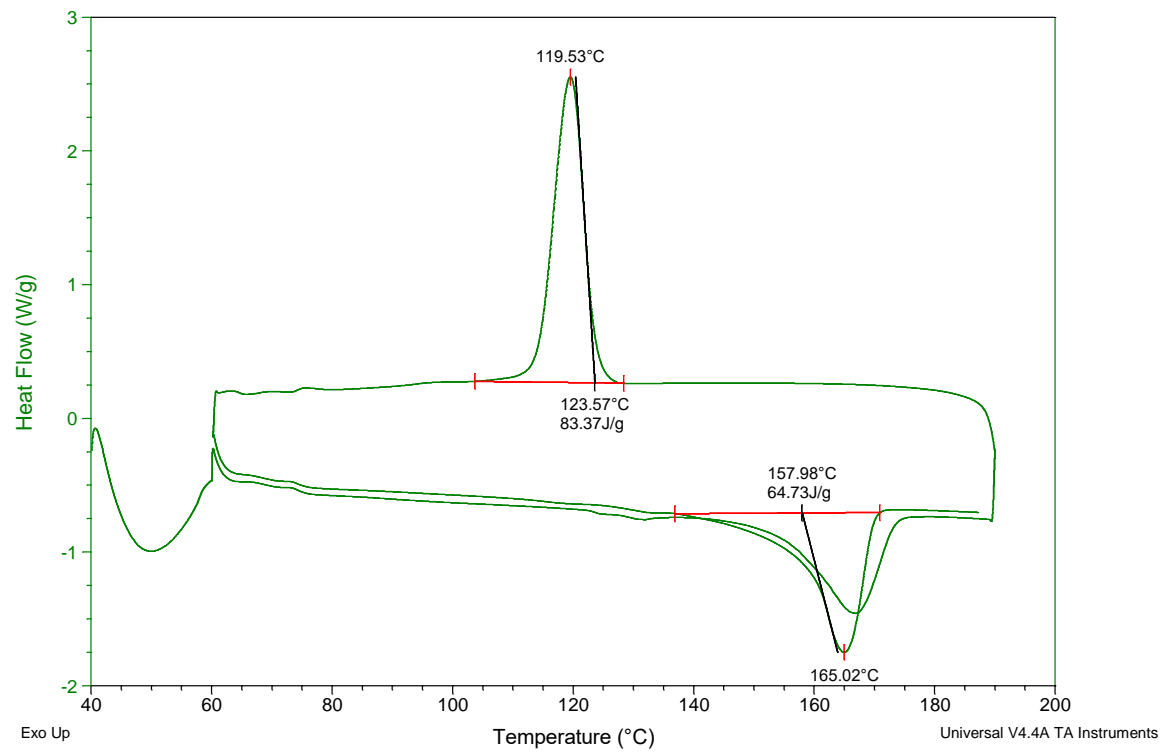


Figura apêndice 24. DSC PP 60 dias.

Sample: 20190209_C7_DSC
Size: 5.0080 mg

DSC

File: E:\dscs(1)\20190209_C7_DSC.001
Operator: TA
Run Date: 09-Feb-2019 09:46
Instrument: DSC Q200 V24.11 Build 124

Comment: 50 mL/min - N2 - 10 °C/min 50 a 300 °C

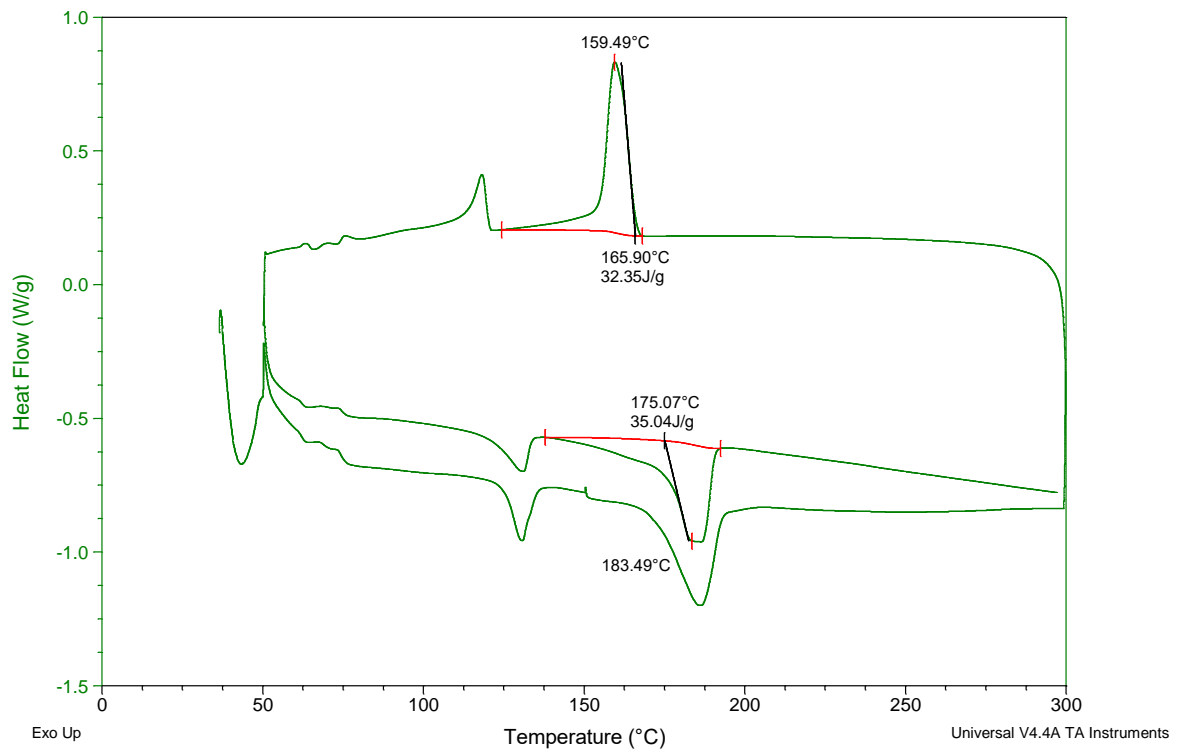


Figura apêndice 25. DSC PA-11 controle.

Sample: 20190209_C10_DSC
Size: 5.0050 mg

DSC

File: E:\dscs(1)\20190209_C10_DSC.001
Operator: TA
Run Date: 09-Feb-2019 15:09
Instrument: DSC Q200 V24.11 Build 124

Comment: 50 mL/min - N2 - 10 °C/min 50 a 300 °C

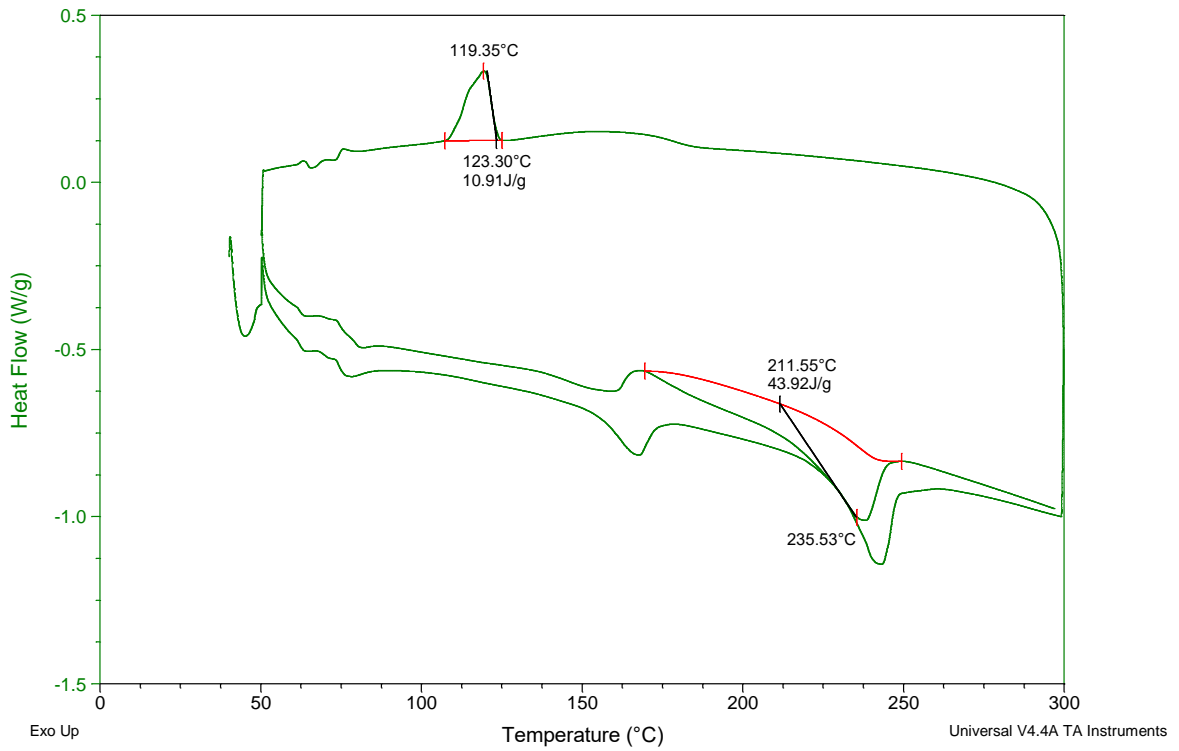


Figura apêndice 26. DSC PET controle.

Sample: 20190209_C11_DSC
Size: 5.0030 mg

DSC

File: E:\dscs(1)\20190209_C11_DSC.001
Operator: TA
Run Date: 11-Feb-2019 12:39
Instrument: DSC Q200 V24.11 Build 124

Comment: 50 mL/min - N2 - 10 °C/min 50 a 300 °C

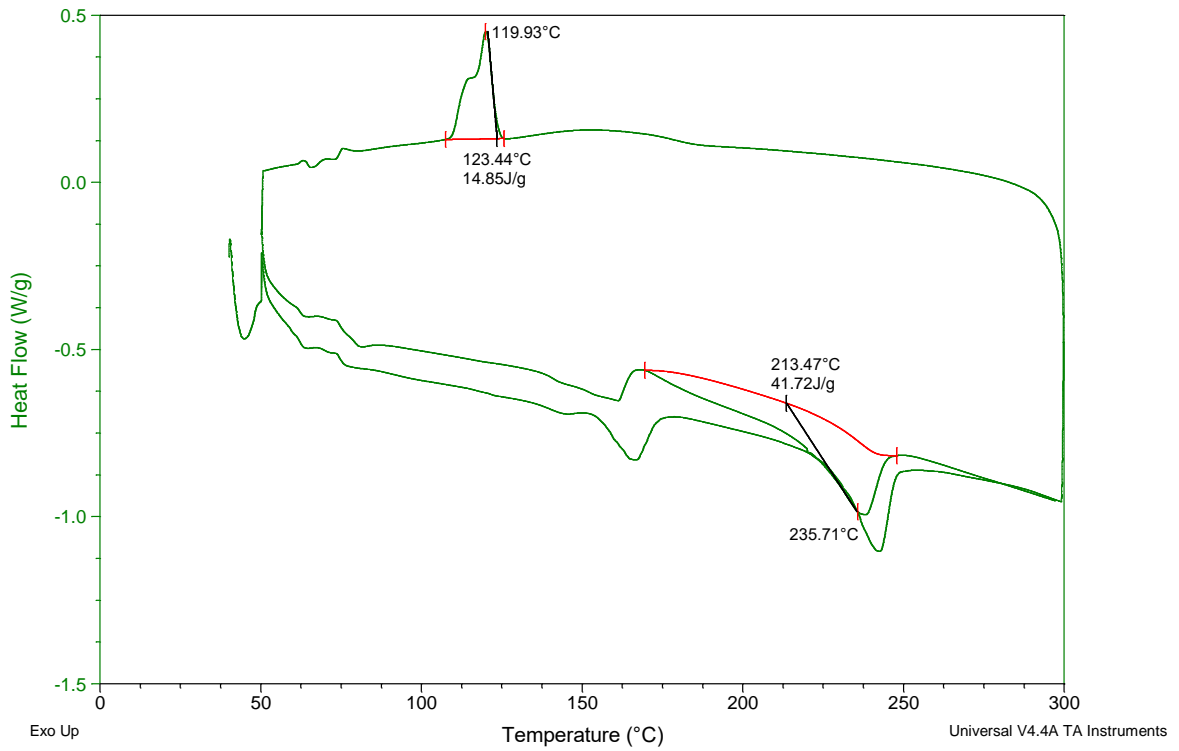


Figura apêndice 27. DSC PET 30 dias.

Sample: 20190212_C12_DSC
Size: 5.0080 mg

DSC

File: E:\dscs(1)\20190212_C12_DSC.001
Operator: TA
Run Date: 12-Feb-2019 07:45
Instrument: DSC Q200 V24.11 Build 124

Comment: 50 mL/min - N2 - 10 °C/min 50 a 300 °C

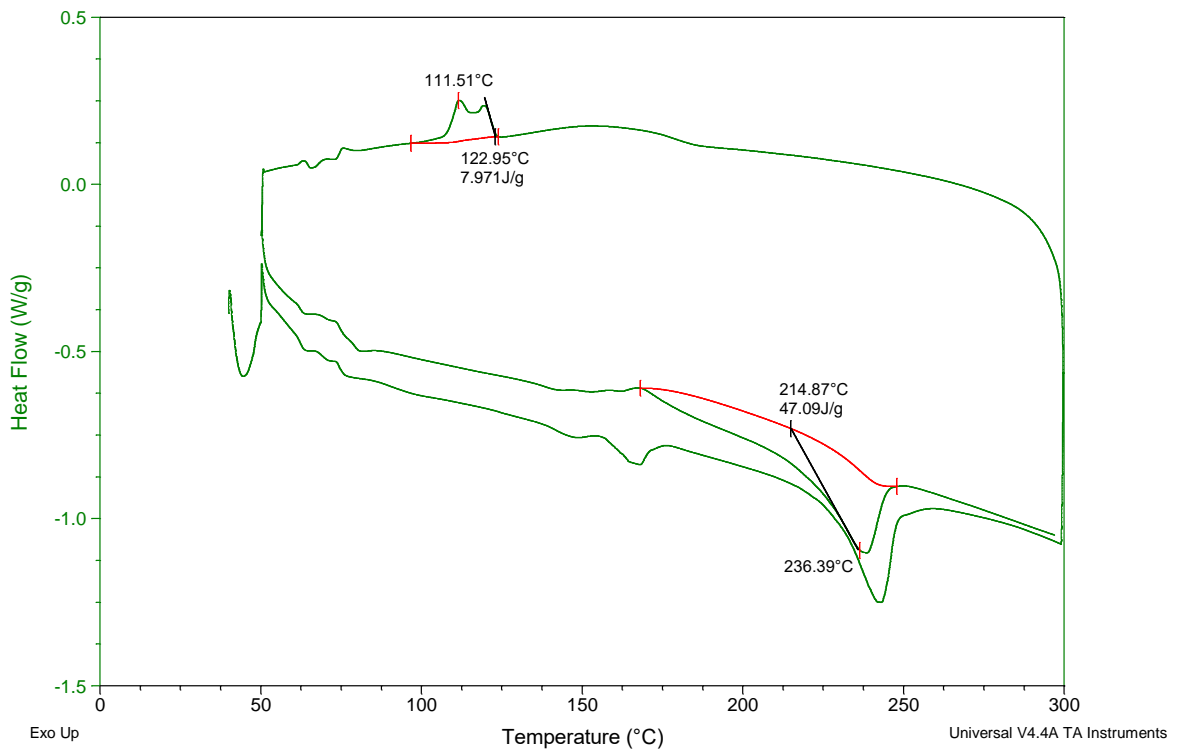


Figura apêndice 28. DSC PET 60 dias.

Sample: 20190212_C15_DSC
Size: 4.9940 mg

DSC

File: E:\dscs(1)\20190212_C15_DSC.001
Operator: TA
Run Date: 12-Feb-2019 14:44
Instrument: DSC Q200 V24.11 Build 124

Comment: 50 mL/min - N2 - 10 °C/min 50 a 300 °C

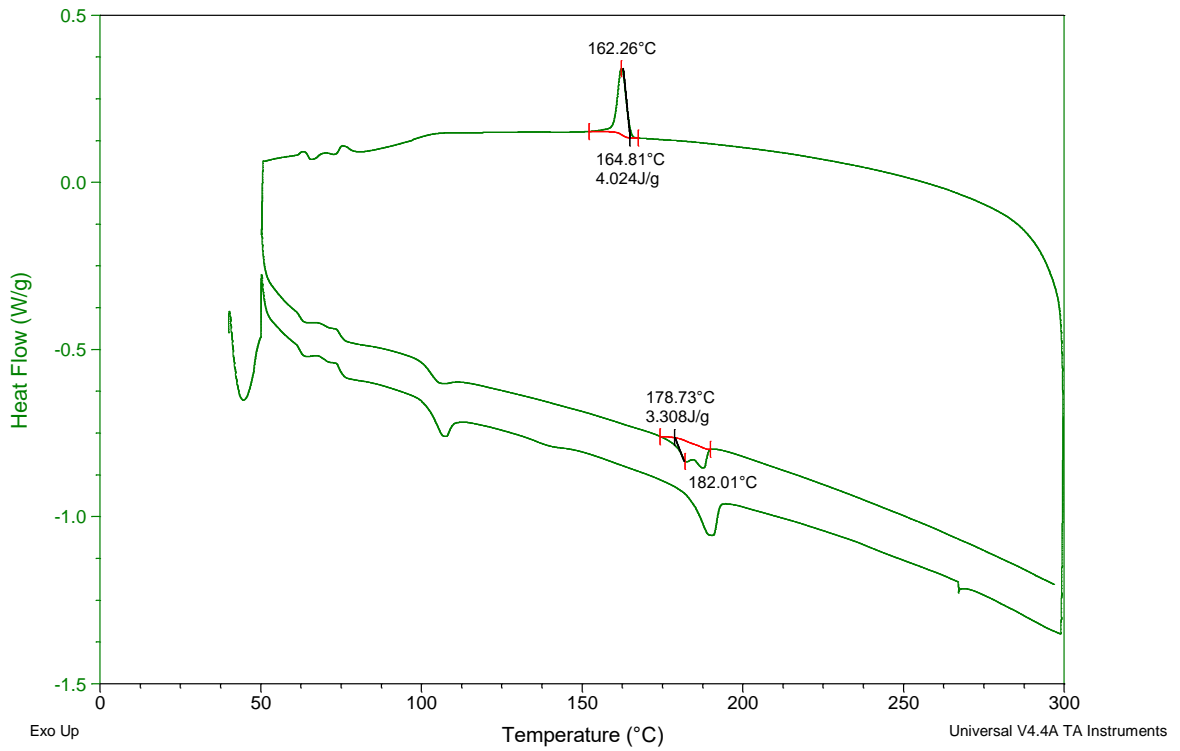


Figura apêndice 29. DSC PS 60 dias.