

MAX LENINE REZENDE DE OLIVEIRA

**BIOSURFACTANTES E NANOPARTÍCULAS DE PRATA E COBRE:  
SÍNTESE E EFEITO SOBRE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

O48b  
2017 Oliveira, Max Lenine Rezende de, 1981-  
Biossurfactantes e nanopartículas de prata e cobre : síntese  
e efeito sobre fungos fitopatogênicos / Max Lenine Rezende de  
Oliveira. – Viçosa, MG, 2017.  
xiii, 90f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Biossurfactantes. 2. Nanopartículas. 3. Fungos  
fitopatogênicos. 4. Microbiologia agrícola. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia Agrícola.  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.  
II. Título.


CDD 22. ed. 668.1


MAX LENINE REZENDE DE OLIVEIRA

**BIOSURFACTANTES E NANOPARTÍCULAS DE PRATA E COBRE:  
SÍNTESE E EFEITO SOBRE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

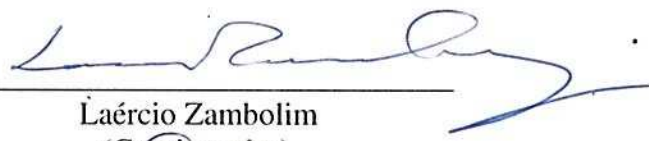
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 30 de outubro de 2017.

  
Álvaro Vianna Novaes de C. Teixeira

  
Péricles Leonardo Fernandes

  
André Narvaes da Rocha Campos

  
Laércio Zambolim  
(Coorientador)

  
Marcos Rogério Tótola  
(Orientador)

DEDICO:

À minha esposa Mariana Bergamaschi e  
à minha filha Maria Clara pelo amor,  
compreensão e paciência pela ausência forçada  
em alguns momentos, meu profundo  
agradecimento.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões e momentos difíceis, principalmente aos meus pais, Maurílio e Maria José.

À minha querida esposa e companheira Mariana pelo amor, pela compreensão, dedicação e ajuda na realização dessa tarefa.

Ao Professor Marcos Rogério Tótola pela confiança, orientação, apoio e amizade durante esses quatro anos de trabalho.

Ao meu coorientador Laércio Zambolim pela amizade, valiosos ensinamentos e oportunidade de trabalho no Laboratório de Proteção de Plantas.

Ao Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa, em especial ao professor Álvaro Vianna pela disponibilização de equipamentos e conhecimento

A toda a equipe do LBBMA pela ajuda, amizade e companheirismo na realização desse trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização desse curso.

Ao Núcleo de Ciências Agrárias e Biológicas Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, pela oportunidade.

Aos professores e funcionários do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, *Campus* Muriaé, pela amizade e socorro nas horas difíceis.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia, pelo apoio.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b><u>CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA</u></b>	
1.1. BIOSURFACTANTES: PROPRIEDADES E AÇÃO ANTIFÚNGICA .....	4
1.2. SÍNTESE E UTILIZAÇÃO DE PARTÍCULAS EM ESCALA NANOMÉTRICA.....	8
1.2.1. Biossíntese de nanopartículas por microrganismos.....	10
1.2.2 Estabilidade de nanopartículas metálicas.....	12
1.2.3. Nanopartículas como agentes antimicrobianos.....	13
1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
<b><u>CAPÍTULO 2. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS POR UM NOVO ISOLADO DE <i>Bacillus subtilis</i> (LBBMA AP 01)</u></b>	
2.1. RESUMO.....	22
2.2. INTRODUÇÃO.....	23
2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.3.1. Isolamento e identificação do isolado <i>Bacillus subtilis</i> LBBMA AP01.....	25
2.3.2. Preservação do microrganismo.....	25
2.3.3. Observação do efeito antagônico do isolado LBBMA A01.....	25
2.3.4. Produção do extrato bruto contendo biossurfactantes pelo isolado LBBMA AP01.....	26
2.3.5. Produção do extrato metanólico via extração por exaustão.....	27
2.3.6 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	27
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
2.4.1. Identificação do microrganismo.....	29
2.4.2. . Avaliação da produção de biossurfactantes e do potencial de inibição do crescimento micelial de <i>Sclerotinea sclerotiorum</i> pelo isolado LBBMA AP01	29
2.4.3. Produção do extrato bruto contendo biossurfactantes pelo isolado <i>B.</i> <i>subtilis</i> LBBMA AP01.....	30
2.4.4 Avaliação da presença de lipopeptídeos no extrato bruto liofilizado de <i>B.</i> <i>subtilis</i> LBBMA AP01 por cromatografia em camada delgada (CCD).....	31

2.5. CONCLUSÕES.....	34
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
<b><u>CAPÍTULO 3. BIOSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E COBRE UTILIZANDO GLICOSE E EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS DE <i>Bacillus subtilis</i> MV 126P.</u></b>	
3.1. RESUMO.....	37
3.2. INTRODUÇÃO.....	38
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.3.1. Microrganismo e condição de cultivo.....	40
3.3.2. Síntese de nanopartículas de prata e cobre por <i>Bacillus subtilis</i> MV 126P.....	40
3.3.3. Síntese de nanopartículas de prata e cobre mediada por glicose.....	41
3.3.4. Caracterização das nanopartículas de prata e cobre.....	41
3.3.5. Avaliação da estabilidade das nanopartículas.....	42
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.4.1. Síntese e caracterização espectrofotométrica das nanopartículas de prata e cobre.....	43
3.4.2. Análise da morfologia e da dimensão das nanopartículas.....	49
3.4.3. Estabilidade das nanopartículas de prata e cobre.....	53
3.5. CONCLUSÕES.....	59
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
<b><u>CAPÍTULO 4 AVALIAÇÃO DE EXTRATOS MICROBIANOS E SUSPENSÕES COLOIDAIS NO CONTROLE DE <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Phakopsora pachyrhizi</i></u></b>	
4.1. RESUMO.....	64
4.2. INTRODUÇÃO.....	66
4.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
4.3.1. Produção do extrato bruto microbiano de <i>B. subtilis</i> LBBMA AP01.....	69
4.3.2. Síntese de nanopartículas de prata e cobre.....	69
4.3.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de biossurfactantes e nanopartículas sobre o crescimento. <i>B. cinerea</i> e <i>S. sclerotiorum</i> .....	70
4.3.4. Efeito de nanopartículas de prata e cobre e biossurfactantes sobre a germinação de esporos de <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Phakopsora pachyrhizi</i> e escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	72
4.3.5. Avaliação da efetividade de extratos microbianos e nanopartículas no controle de fitopatógenos <i>in vivo</i> .....	73
4.3.6. Análises estatísticas.....	75

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.4.1. Efeito de nanopartículas e biossurfactantes no crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Sclerotinea sclerotiorum</i> .....	76
4.4.2. Efeito de nanopartículas e biossurfactantes sobre a germinação de esporos <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Phakopsora pachyrhizi</i> e escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	79
4.4.3. Avaliação da efetividade de extratos microbianos e suspensões coloidais no controle de fitopatógenos <i>in vivo</i> .....	80
4.5. CONCLUSÕES.....	86
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

## LISTA DE FIGURAS.

Figura 1.1.	Fenômeno de resistência sistêmica induzida (ISR), ocasionada pelo agente de biocontrole <i>B. subtilis</i> .....	8
Figura 1.2.	O cálice de Licurgo. Observe a cor esverdeada do cálice à esquerda sob a luz refletida e à direita sob a luz transmitida. Efeito proporcionado por nanopartículas de prata-ouro.....	9
Figura 1.3.	Imagem obtida através de microscopia de transmissão eletrônica (TEM) de <i>B. licheniformes</i> cultivado em meio contendo nitrato de prata na concentração de 1mM, mostrando a formação de nanopartículas de prata ao logo da periferia da célula.....	11
Figura 2.1.	(A) potencial hemolítico em TSA sangue <i>Bacillus subtilis</i> LBBMA AP01; (B) LBBMA AP01 cultivado juntamente com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ; (C) controle com <i>S. sclerotiorum</i> sem a repicagem de LBBMA AP01.....	30
Figura 2.2.	Espalhamento em óleo ao longo de 96 horas de incubação. Observa-se um decréscimo significativo (teste de Tukey a 5 % de probabilidade) no diâmetro dos halos de espalhamento a partir de 24 horas de incubação.....	31
Figura 2.3.	Placa de CCD contendo o extrato metanólico de <i>B. subtilis</i> LBBMA AP01. Fengicina (F) Rf = 0,23, iturina (I) Rf = 0,47 e surfactina (S) Rf = 0,77. Fase móvel clorofórmio:metanol:água – 65:25:4. Revelador: Ácido sulfúrico 15% em etanol, seguido de aquecimento com soprador térmico.....	32
Figura 2.4.	Exemplos de moléculas das principais famílias de lipopeptídeos produzidos por <i>B. subtilis</i> , encontrados também em LBBMA AP01..	33
Figura 3.1.	Produção de nanopartículas de prata (AgNPs) com sobrenadante de <i>Bacillus subtilis</i> MV 126P obtido sob diferentes períodos de incubação:0, 12, 18, 24, 36 e 48 horas.....	43
Figura 3.2.	(A) Nanopartículas de prata sintetizadas com glicose; (B) Nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato de <i>B. subtilis</i> MV 126P ;(C) Nanopartículas de cobre sintetizadas com glicose.....	44
Figura 3.3.	Efeito da concentração de AgNO <sub>3</sub> e CuSO <sub>4</sub> sobre a produção de AgNps e CuNPs.....	45
Figura 3.4.	Espectros de absorção na região do ultravioleta visível (UV-VIS) das nanopartículas de prata sintetizadas com extrato livre de células de <i>B. subtilis</i> MV 126P (A); das AgNps sintetizadas com glicose (B) e CuNps sintetizadas com glicose (C).....	47
Figura 3.5.	Micrografias eletrônicas de transmissão de nanopartículas de prata sintetizadas usando extrato livre de células de <i>B. subtilis</i> MV 126P (A e B) e glicose (C e D) e nanopartículas de cobre produzidas com glicose (E e F).....	50
Figura 3.6.	Imagens de microscopia de força atômica de nanopartículas de prata sintetizadas com extrato livre de células de <i>B. subtilis</i> isolado MV 126P (A e B) e glicose (C e D) e nanopartículas de cobre produzidas com glicose (E e F).....	51
Figura 3.7.	Distribuição de tamanho das nanopartículas determinado pelo espalhamento dinâmico de luz. Nanopartículas de prata produzidas	

	com extrato livre de células de <i>B. subtilis</i> isolado MV 126P (A) e glicose (B) e nanopartículas de cobre produzidas com glicose (C).....	52
Figura 3.8.	Espectros de absorção na região do ultravioleta visível (UV-VIS) das nanopartículas de prata (AgNps) sintetizadas com glicose estabilizadas com diferentes doses de ramnolípídeo. AgNps recém sintetizadas e estabilizadas (A); AgNps após 150 dias de armazenamento em solução (B).....	54
Figura 3.9.	Espectros de absorção na região do ultravioleta visível (UV-VIS) das nanopartículas de cobre (CuNps) sintetizadas com glicose estabilizadas com diferentes doses de ramnolípídeo. CuNps recém sintetizadas e estabilizadas (A); CuNps após 150 dias de armazenamento em solução (B).....	55
Figura3.10	(A) Espectro de absorção na região do ultravioleta visível (UV-VIS) das nanopartículas de cobre (CuNps) sintetizadas com glicose e estabilizadas com diferentes doses de ramnolípídeo (Rhl). (B) Micrografia eletrônica de transmissão das CuNps estabilizadas com Rhl a 3,9 g/L, evidenciando a presença de halos formados pelo Rhl ao redor das partículas.....	57
Figura 4.1.	Avaliação do crescimento micelial <i>in vitro</i> dos fungos fitopatogênicos <i>B. cinerea</i> e <i>S. sclerotiorum</i> na presença de agentes inibidores.....	77
Figura 4.2.	Efeito das nanopartículas de prata (AgNps) e ramnolípídeo (Rhl), aplicados separadamente ou em combinação, sobre o crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> .....	78
Figura 4.3.	Efeito dos diferentes tratamentos <i>in vivo</i> sobre o fitopatógeno <i>B. cinerea</i> em pétalas de rosas.....	81
Figura 4.4.	Efeito dos diferentes tratamentos <i>in vivo</i> sobre o fitopatógeno <i>S. sclerotiorum</i> em folhas de repolho.....	82
Figura 4.5.	Imagens demonstrando o efeito combinado das AgNps e Ramnolípídeo no controle de <i>B. cinerea</i> e <i>S. sclerotiorum</i> e a fitotoxidez gerada por AgNO <sub>3</sub> sobre as pétalas rosas e folhas de repolho.....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.	Lista de glicolípídeos e lipopeptídeos, produzidos por <i>Pseudomonas</i> spp e <i>Bacillus</i> spp, respectivamente, os quais demonstraram efeito no desenvolvimento de alguns fungos fitopatogênicos.....	6
Tabela 3.1.	Valores médios de distribuição e intensidade (%) de tamanho (nm) das nanopartículas de prata sintetizadas usando extrato livre de células de <i>B. subtilis</i> MV 126P (AgNps <i>B. subtilis</i> ) e glicose (AgNps glicose ) e nanopartículas de cobre produzidas com glicose (CuNps glicose).....	52
Tabela 4.1.	Concentrações finais dos produtos utilizados para ensaio de determinação concentração mínima inibitória (CMI) do crescimento miscelogenico de <i>B. cinerea</i> e <i>S. sclerotiorum</i> <i>in vitro</i> ..	71
Tabela 4.2.	Concentrações finais dos produtos utilizados para ensaio de efeito sobre a germinação de esporos e escleródios dos fungos fitopatogênicos.....	73
Tabela 4.3.	Concentrações finais dos produtos utilizados para ensaio do efeito dos biossurfactantes e das nanopartículas sobre o controle dos fungos fitopatogênicos <i>in vivo</i> .....	75
Tabela 4.4.	Concentrações mínimas inibitórias (CMI) sobre o crescimento miscelogenico de <i>B. cinerea</i> e <i>S. sclerotiorum</i> <i>in vitro</i> .....	76
Tabela 4.5.	Efeito de nanopartículas e biossurfactantes sobre a germinação/formação de colônias de esporos de <i>P. pachyrizi</i> e <i>B. cinerea</i> e germinação de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> .....	80

## RESUMO

OLIVEIRA, Max Lenine Rezende de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Outubro de 2017. **Biossurfactantes e nanopartículas de prata e cobre: síntese e efeito sobre fungos fitopatogênicos.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientadores: Laércio Zambolim e Maurício Dutra Costa.

Neste trabalho foi avaliada a hipótese de que biossurfactantes e nanopartículas de prata (AgNps) e cobre (CuNps), estabilizadas com biossurfactantes, são eficazes na inibição de fungos fitopatogênicos *in vitro* e *in vivo*. Para tal, foram utilizados um ramnolípídeo, um extrato livre de células de um novo isolado de *Bacillus subtilis* LBBMA AP01, AgNps e CuNps produzidas utilizando-se sobrenadante de *B. subtilis* MV 126P ou glicose como redutores (ou catalisadores da reação). A estabilidade das nanopartículas foi também avaliada em resposta à adição de ramnolípídeo como agente estabilizante. Em placas de cromatografia onde se aplicou o extrato metanólico do isolado *B. subtilis* LBBMA AP01, foram encontradas manchas com valores de fator de retenção (*R<sub>f</sub>*) semelhantes aos valores de padrões comerciais dos lipopeptídeos surfactina, iturina e fengicina. Foram obtidas nanopartículas de prata e cobre esféricas com tamanhos variáveis quando se utilizou glicose como agente redutor. O extrato de *B. subtilis* MV 126P não foi eficiente como catalisador da síntese de CuNps, sendo-o, porém, para a produção de AgNps. O ramnolípídeo mostrou-se eficiente na manutenção da estabilidade das nanopartículas, impedindo sua agregação e oxidação durante todo o período de avaliação (150 dias). Nos testes de inibição, foram utilizados três importantes fungos fitopatogênicos - *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phakopsora pachyrhizi*. Foram avaliadas a germinação de esporos e escleródios e a formação de colônias resultantes do processo de germinação dessas estruturas. Avaliou-se também o crescimento micelial *in vitro* de *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* e o índice de doença provocada por esses patógenos em pétalas de rosa e em folhas de repolho pulverizadas com soluções contendo nanopartículas e biossurfactantes. O extrato de *B. subtilis* LBBMA AP 01, o ramnolípídeo e as AgNps inibiram significativamente a germinação das estruturas reprodutivas dos três patógenos, além do crescimento micelial de *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* *in vitro*. No experimento *in vivo*, o extrato de *B. subtilis* LBBMA AP 01, ramnolípídeo e as AgNps foram eficientes no controle da infecção por *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*. Conclui-se que os agentes de controle avaliados nesse trabalho são promissores para utilização comercial. A avaliação

de sua eficiência como agentes de controle de outras espécies de fungos fitopatogênicos pode expandir o potencial de aplicação desses compostos, em substituição aos fungicidas convencionais. Essa possibilidade é de grande relevância ambiental e para setores específicos, como o de agricultura orgânica.

**Palavras chave:** lipopeptídeo, ramnolípídeo, nanopartículas metálicas, fungos fitopatogênicos e biofungicida.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Max Lenine Rezende de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October 2017. **Biosurfactants and silver and copper nanoparticles: synthesis and effect on phytopathogenic fungi.** Advisor: Marcos Rogério Tótola. Co-advisers: Laércio Zambolim and Maurício Dutra Costa.

In this work the hypothesis that products of microbial metabolism such as biosurfactants and silver (AgNps) and copper nanoparticles (CuNps), stabilized with biosurfactants, are evaluated in inhibition of phytopathogenic fungi *in vitro* and *in vivo*. For this, a rhamnolipid, a cell-free extract of a novel *Bacillus subtilis* isolate LBBMA AP01, AgNps and CuNps produced using alternative compounds as supernatant of *B. subtilis* MV 126P and glucose were used. The stability of the nanoparticles was also evaluated in response to the addition of rhamnolipid as a stabilizing agent. In chromatography plates where the methanolic extract of the *B. subtilis* isolate LBBMA AP01 was applied, spots with retention factor (Rf) values similar to the commercial standards of the lipopeptides surfactin, iturin and fengicin were found. Spherical silver and copper nanoparticles with variable sizes were obtained when using glucose as a reducing agent. The extract of *B. subtilis* MV 126P was not efficient as a catalyst for the CuNps synthesis, but it was used for the production of AgNps. The rhamnolipid was efficient in maintaining the stability of the nanoparticles, preventing their aggregation and oxidation during the entire evaluation period (150 days). In the inhibition tests, three important phytopathogenic fungi - *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phakopsora pachyrhizi* were used. The germination of spores and sclerotia and the formation of colonies resulting from the germination process of these structures were evaluated. The *in vitro* mycelial growth of *B. cinerea* and *S. sclerotiorum* and the disease index caused by these pathogens in rose petals and cabbage leaves sprayed with solutions containing nanoparticles and biosurfactants were also evaluated. The extract of *B. subtilis* LBBMA AP 01, rhamnolipid and AgNps significantly inhibited the germination of the reproductive structures of the three pathogens, in addition to the mycelial growth of *B. cinerea* and *S. sclerotiorum* *in vitro*. In the *in vivo* experiment, extract of *B. subtilis* LBBMA AP 01, rhamnolipid and AgNps were efficient in controlling infection by *B. cinerea* and *S. sclerotiorum*. We conclude that the control agents evaluated in this work are promising for commercial use. The evaluation of its efficiency as control agents of other species of phytopathogenic

fungi can expand the potential of application of these compounds, replacing the conventional fungicides. This possibility is of great environmental importance and for specific sectors such as organic agriculture.

Key words: lipopeptide, rhamnolipid, metal nanoparticles, phytopathogenic fungi and biofungicide.

## INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil figura entre os maiores produtores mundiais de alimentos de origem vegetal, principalmente cereais, leguminosas e oleaginosas (CONAB, 2017). A safra 2016 atingiu cerca de 184,7 milhões de toneladas, correspondendo a uma área plantada de aproximadamente 57,1 milhões de hectares, com destaque para a produção de soja, que responde por mais de 96 milhões de toneladas da produção nacional de grãos (IBGE, 2017).

O crescimento da produção total de produtos agrícolas se deve principalmente ao aumento da área plantada (CONAB, 2017) e ao uso de produtos fitossanitários para o controle de doenças e pragas, com destaque para os herbicidas, inseticidas e fungicidas, que respondem pelo maior volume de defensivos agrícolas utilizado no país. Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa vegetal (SINDIVEG), em 2016 as vendas desses produtos no Brasil corresponderam a aproximadamente 18 % do total mundial, movimentando US\$ 9,56 bilhões. Nessa estatística não são consideradas as vendas de produtos ilegais, que podem chegar a 20% do total consumido.

A importação do setor atingiu 414.975 toneladas em 2016 e apresentou crescimento de 5,72% em relação ao ano anterior. Do total de produtos fitossanitários consumidos, 85% são importados. A classe que apresentou maior aumento percentual nas importações foi a dos fungicidas, com 59,72% (SINDIVEG, 2017).

No Brasil, o clima tropical favorece a ocorrência de doenças causadas por fungos, especialmente a ferrugem da soja, cada vez mais agressiva. Por essa razão, os fungicidas passaram a ser a classe de produtos fitossanitários mais comercializada em 2016, respondendo por 33% do mercado. A comercialização de fungicidas, em 2016, movimentou US\$ 3,15 bilhões no Brasil, o que correspondeu a aproximadamente 161.107 toneladas de produto comercial e 75.692 toneladas de ingrediente ativo (SINDIVEG, 2017).

A produção agrícola mundial é realizada predominantemente em sistemas de cultivo denominados de “convencionais” (KREMEN, et al., 2012). Nesses sistemas, fungos fitopatogênicos constituem um grande problema fitossanitário, requerendo a utilização cada vez mais intensa de defensivos agrícolas para seu controle, a fim de se

evitarem perdas severas de produção quando as condições climáticas são favoráveis aos patógenos (VALE et al., 2004).

O emprego de grandes quantidades de defensivos agrícolas muitas vezes resulta na deposição de resíduos no ambiente e nos alimentos (SEIBER & KLEINSCHMIDT, 2011). A ampla utilização desses produtos, o desconhecimento dos riscos associados à sua utilização, o desrespeito às normas básicas de segurança, a livre comercialização, a grande pressão comercial por parte das empresas distribuidoras e produtoras e os problemas sociais encontrados no meio rural constituem importantes causas que levam ao agravamento dos quadros de contaminação humana e ambiental observados no Brasil (MIRANDA et al, 2007).

Muitos agroquímicos podem ser letais a inimigos naturais e microrganismos benéficos da rizosfera e do filoplano (AKTAR et al., 2009). A eliminação de organismos benéficos abre espaço para o desenvolvimento de pragas e patógenos, levando ao agravamento dos problemas fitossanitários (BARBOSA, 1998). Pesticidas podem ainda persistir por longos períodos no solo, onde podem causar alterações na estrutura e função das comunidades microbianas ali existentes. Tais alterações podem ter reflexo nos ciclos biogeoquímicos de elementos essenciais, os quais são vitais para a manutenção da fertilidade do solo (BACMAGA et al., 2015; BOROWIK et al., 2017).

Para que a vocação agrícola do Brasil possa ser exercida em sua plenitude, torna-se necessária uma revisão de conceitos e princípios tecnológicos, buscando-se novas alternativas para contrapor o modelo vigente de agricultura e alcançar uma coexistência harmônica entre os processos produtivos, utilização de recursos naturais e preservação ambiental (MANDAIL et al., 2011). Nesse sentido, o retorno ao sistema de produção agrícola com uso racional, ou mesmo isento de defensivos químicos que contaminam o ambiente e os alimentos, começa a ser praticado pelos produtores. Essa transformação tem como principal motivação a conscientização dos consumidores e dos produtores agrícolas em relação aos malefícios de alguns agroquímicos para a saúde do produtor, dos consumidores, dos animais e do meio ambiente.

Para que esse movimento de transformação cultural possa se dar sem o comprometimento da oferta de alimentos para uma população mundial crescente, é primordial a busca por novas técnicas e produtos para o manejo de doenças e pragas agrícolas, que proporcionem a manutenção ou mesmo o aumento da produtividade

agrícola e interfiram o mínimo possível nos processos biológicos naturais e não deixem resíduos perigosos no ambiente e nos alimentos. Nos últimos anos, tem se verificado um significativo crescimento de cultivos diferenciados, com destaque para aqueles em ambientes protegidos e principalmente sob sistemas orgânicos de produção (CHAGAS et al., 2016).

Nesse contexto, a utilização de produtos do metabolismo de microrganismos, como biossurfactantes, ou materiais em escala nanométrica (nanopartículas), constitui uma alternativa frente ao uso maciço de pesticidas convencionais para controle de doenças de plantas em alguns patossistemas importantes (ONGENA & JACQUES, 2008; D'AES, et al., 2010; KANHED, et al., 2014; OUDA, 2014).

No presente trabalho, objetivou-se produzir e utilizar compostos alternativos - biossurfactantes e nanopartículas de prata e cobre - como agentes antifúngicos para o controle de alguns fitopatógenos de importância agrícola no Brasil: *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phakopsora pachyrhizi*.

## CAPÍTULO 1

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.1. BIOSSURFACTANTES: PROPRIEDADES E AÇÃO ANTIFÚNGICA

Moléculas conhecidas como surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle de produtos que possam afetar o meio ambiente, têm estimulado a procura por surfactantes naturais (biossurfactantes) como alternativa aos produtos sintéticos existentes (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção hidrofóbica é frequentemente constituída de um grupo alquila, enquanto a porção hidrofílica pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou zwitteriônica (DESAI & BANATI 1997). Esse arranjo molecular proporciona aos biossurfactantes propriedades e funções muito interessantes.

Algumas propriedades e funções dos biossurfactantes são bem conhecidas, como a redução da tensão superficial e interfacial, a emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos e outras moléculas insolúveis em água, o favorecimento da aderência de células a superfícies e a atividade antimicrobiana (KIRAN et al., 2011). Nos últimos anos, os biossurfactantes têm atraído a atenção da comunidade científica por seu potencial de utilização em processos de remediação de ambientes contaminados, na recuperação melhorada de petróleo e no controle de microrganismos patogênicos (D'AES et al., 2010; SRIRAM et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015; SUMI et al; 2015). Hoje existe uma forte tendência na produção e utilização de biossurfactantes como compostos antimicrobianos (JOSHI et al., 2008).

A ação efetiva dos biossurfactantes no controle de oomicetos como *Pythium ultimum* e *Phytophthora infestans* tem sido reportada pela literatura especializada (TRAN et al., 2007; HULTBERG et al., 2010; BENGTONSON et al., 2015). No entanto, essa ação pode se estender para outros grupos de fungos fitopatogênicos (PYOUNG II et al., 2010; D'AES et al., 2010).

Os biossurfactantes são divididos em classes de acordo com seu peso molecular e efetividade na redução da tensão interfacial (DESAI & BANATI, 1997). Duas classes desses compostos são de grande importância e relativamente bem estudadas em relação às suas propriedades antagônicas a organismos fitopatogênicos (Tabela 1.1): os glicolipídeos e os lipopeptídeos (D'AES et al., 2010).

Os glicolipídeos são constituídos de carboidratos e ácidos alifáticos de cadeia longa ou hidroxialifáticos. Os mais conhecidos são os ramnolipídeos, os trealolipídeos e os soforolipídeos (DESAI & BANATI, 1997). Dentre o glicolipídeos, os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas* spp. têm ganhado maior destaque e são os mais estudados, considerando suas propriedades antimicrobianas (HULTBERG et al., 2010; BORAH et al., 2016; DEEPIKA et al., 2017).

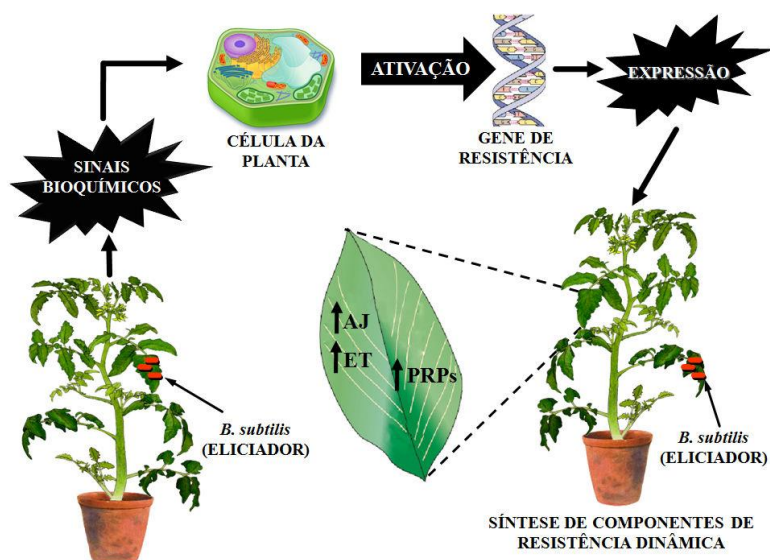
**Tabela 1.1:** Glicolipídeos e lipopeptídeos com atividade contra fungos fitopatogênicos

<b>Microrganismo produtor</b>	<b>Patógeno</b>	<b>Biossurfactante</b>	<b>Referência</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Ramnolipídeo	VARNIER et al., 2009
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>	Ramnolipídeo	BORAH et al., 2016
<i>Pseudomonas koreensis</i>	<i>Pytium ultimum</i>	Lokisina	HULTBERG et al., 2010
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	Ramnolipídeo	BENGTSON et al., 2015
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Iturina/fengicina/surfactina	ALVAREZ et al., 2011
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Coletotrichum gloesporioides</i>	Iturina/fengicina/surfactina	PYOUNG II et al., 2010
<i>B. subtilis</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Fengicina	GUO et al., 2015
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	Iturina e fengicina	GOND et al., 2015

Os lipopeptídeos são surfactantes lipoproteicos, amplamente reconhecidos por suas propriedades antimicrobianas (DESAI & BANATI 1997). São produzidos por membros do gênero *Bacillus*, com destaque para isolados da espécie *Bacillus subtilis*, que produzem uma grande variedade de compostos antimicrobianos, incluindo os lipopeptídeos iturina, fengicina e surfactina. (DESAI & BANATI 1997). Esses lipopeptídeos são estruturalmente semelhantes, mas possuem atividades biológicas diferentes. Iturinas e fengicinas exercem efeito antifúngico sobre fitopatógenos, enquanto que em relação à surfactina, esse efeito é reduzido ou inexistente (PYOUNG II et al., 2010). Entretanto, existem relatos da existência de efeito sinérgico da surfactina com a iturina, o qual pode aumentar a atividade antifúngica (MAGET-DANA et al., 1992; PYOUNG II et al., 2010).

Vários biossurfactantes, como os ramnolipídeos e os lipopeptídeos, podem atuar como agentes antifúngicos. Os efeitos desses compostos podem ser observados pela inibição do crescimento do micélio ou da germinação de esporos e pela lise dessas estruturas reprodutivas de uma grande variedade de fungos fitopatogênicos (HULTBERG et al., 2010; PERNEEL, et al., 2008; VARNIER, et al., 2009).

Além das propriedades antimicrobianas, glicolipídeos e lipopeptídeos têm um papel adicional no controle de fungos fitopatogênicos (Figura 1.1). Biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. e outras rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR) podem suprimir doenças de plantas da parte aérea e da raiz, por induzir uma resposta de defesa do hospedeiro conhecida como “resistência sistêmica induzida” ou ISR (D’AES, et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Ramnolipídeos, surfactinas e fengicinas têm sido descritas como moléculas elicitoras da IRS em plantas (OGENA et al., 2007; TRAN et al., 2007; VARNIER et al., 2009). Os mecanismos de indução ainda não são claros, mas podem estar relacionados com a composição estrutural dos biossurfactantes e de receptores específicos na membrana da célula vegetal, onde os biossurfactantes podem se ligar e ativar uma cascata de sinais, levando ao aumento das respostas de defesa da planta (JOURDAN et al., 2009; RAAIJMAKERS et al., 2010).



**Figura 1.1:** Modelo do fenômeno de resistência sistêmica induzida (ISR), ocasionada pelo agente de biocontrole *B. subtilis*. A produção e liberação de metabólitos incitam a geração de sinais bioquímicos celulares e a transcrição de genes de defesa responsáveis pela expressão de proteínas relacionadas à patogênese (adaptado de LANA FILHO et al., 2010).

Ainda há muito a se revelar sobre as propriedades físico-químicas e biológica dos biossurfactantes e seus efeitos sobre os organismos vivos. Novos isolados bacterianos produtores de moléculas distintas de biossurfactantes podem auxiliar na elucidação de vários aspectos ligados a essa linha de pesquisa. Segundo D'AES et al. (2010), os biossurfactantes emergem como moléculas universais, com grande variedade de uso e produzidas por uma ampla gama de microrganismos, muitos ainda por serem descobertos. Com o avanço nos estudos desses metabólitos, novos produtos poderão ser formulados para utilização agrônômica no controle de enfermidades de plantas.

## 1.2. SÍNTESE E UTILIZAÇÃO DE PARTÍCULAS EM ESCALA NANOMÉTRICA

Os primeiros relatos de sistemas em escala de nanopartículas datam de épocas bem anteriores à ciência moderna, quando nanopartículas metálicas eram usadas para produzir efeitos coloridos em vidros e cerâmicas (LIZ-MARZÁN, 2004). Um dos primeiros relatos é um artefato romano do século IV a.C., conhecido como Cálice de Licurgo, confeccionado por um vidraceiro romano, no qual se retratava a lenda do rei Licurgo em sua ornamentação. O objeto apresentava uma curiosa propriedade: quando

visualizado por reflexão apresentava a coloração esverdeada e por transmissão tornava-se avermelhado (Figura 1.2). Esse efeito fantástico era devido à presença de uma mistura de nanopartículas de ouro e prata em sua composição (FREESTONE et al., 2007). Já na era medieval, a partir do ano 500 d.C., artesãos vidraceiros produziam vitrais coloridos utilizando nanopartículas metálicas. As nanopartículas de ouro conferiam a coloração vermelha à matriz vítrea, enquanto as de prata a coloração amarela (BONACIN, 2007).



**Figura 1.2:** O cálice de Licurgo. Observe a cor esverdeada do cálice à esquerda sob a luz refletida e à direita sob a luz transmitida. Efeito proporcionado por nanopartículas de prata-ouro. (Fonte: The History Blog - <http://www.thehistoryblog.com/archives/26724>. Acessado em 23/08/2017).

Nos últimos anos, é crescente o interesse da comunidade científica pela nanociência, no que se refere às mudanças nas propriedades físicas de determinados sólidos quando suas dimensões são reduzidas à escala nanométrica (1 a 1.000 nm). Destaca-se ainda o interesse pela possibilidade de controle sobre os componentes estruturais de materiais e dispositivos em escalas de tamanho bem inferiores às aquelas convencionais (HUANG et al., 2010).

O interesse da comunidade científica pelas nanopartículas metálicas advém das suas propriedades físico-químicas e ópticas que lhes confere inúmeras aplicações, incluindo aquelas na área médica, na agricultura e indústria eletrônica (DURAN et al., 2011)

Soluções coloidais de metais são sistemas em nanoescala particularmente interessantes, dada a facilidade com que podem ser preparadas e modificadas quimicamente (MELO Jr. et al., 2012). Alterações no tamanho e nas formas podem provocar grandes modificações nas propriedades físicas e na reatividade de determinado composto (MELO JR., et al., 2012). No caso das propriedades ópticas, a mudança e diversidade de cores observada quando uma nanopartícula é sintetizada está relacionada às oscilações dos elétrons de condução, em ressonância com a luz incidente, denominada ressonância dos plasmons de superfície.

Uma grande variedade de metodologias tem sido descrita para a síntese e caracterização de diversas nanopartículas, incluindo as de ouro, prata e cobre. A síntese de nanopartículas de prata e cobre tem sido realizada por redução química (DANG, et al., 2011; KOBAYASHI, 2013;), empregando-se principalmente o borohidreto de sódio como agente redutor, e a redução eletrolítica, na qual se utiliza uma pequena descarga elétrica em solução aquosa (JO et al., 2009). Mais recentemente, têm sido utilizadas metodologias baseadas no uso de extratos vegetais (CHEIRMADURAI, et al., 2014), produtos do metabolismo microbiano, como biossurfactantes (FARIAS, et al., 2014), filtrados de culturas bacterianas (GURUNATHAN, et al., 2009) e compostos inócuos como a glicose (PANIGRAHI et al., 2006). A biossíntese de nanopartículas metálicas por redução química é um método ambientalmente vantajoso (“green chemistry”) em relação ao uso de agentes químicos convencionais tóxicos, que são caros e às vezes muito tóxicos (IRAVANI, 2011).

### **1.2.1. Biossíntese de nanopartículas por microrganismos**

Muitos microrganismos são capazes de sintetizar nanopartículas, estando envolvidos na manutenção de ciclos biogeoquímicos de alguns metais, realizando processos como precipitação, decomposição e degradação de compostos organometálicos (GADD, 2010). Nem todos os microrganismos são capazes de sintetizar nanopartículas metálicas. Aqueles que apresentam essa capacidade devem ainda desenvolver uma maquinaria própria de resistência às nanopartículas do metal que será transformado (DEEPAK, et al, 2011).

A produção de compostos em escala nanométrica por microrganismos pode se dar tanto intracelularmente como no meio extracelular (NARAYANAN E& SAKTHIVEL,

2010). No primeiro caso, os organismos absorvem o metal, o qual é então reduzido intracelularmente e convertido em nanomateriais por rotas metabólicas derivadas da membrana da célula. As nanopartículas acumulam-se, nesse caso, na periferia da célula. PADIAN et al (2010) demonstraram a eficiência de *Bacillus licheniformes* em produzir e acumular nanopartículas de prata, sendo esse processo responsável pela resistência do organismo à toxicidade dos íons  $\text{Ag}^+$  (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** Imagem obtida através de microscopia de transmissão eletrônica (TEM) de *B. licheniformes* cultivado em meio contendo nitrato de prata na concentração de 1mM, mostrando a formação de nanopartículas de prata ao longo da periferia da célula (Adaptada de PADIAN et al. (2010)).

A biossíntese extracelular requer um processamento mais simples, o que favorece a produção em grande escala de nanopartículas metálicas. Muitos estudos têm focado na síntese extracelular de nanopartículas metálicas, especialmente por meio do uso de extratos livres de células (TAQUIA-ARASHIRO & RODRIGUES, 2016). Estudos com sobrenadantes de culturas bacterianas do gênero *Bacillus* têm comprovado sua eficiência na obtenção de nanopartículas (SAIFUDDIN et al, 2009, VELMURUGAN et al., 2014). Estudos sobre redução de íons metálicos com fungos também têm destacado seu potencial para formação de nanopartículas extracelularmente (CASTRO-LOGORIA et al.; 2011; CUEVAS et al.; 2015).

O principal mecanismo de síntese extracelular é a excreção de moléculas redutoras. Essas biomoléculas envolvidas na biorredução de íons metálicos podem ser enzimas, proteínas, peptídeos e polissacarídeos (DEEPAK et al., 2011). Dentre esses

compostos, alguns têm seus mecanismos de ação mais conhecidos, em especial algumas enzimas redutoras (SIGH et al., 2016).

As nitrato-redutases NADH-dependentes têm demonstrado eficiência na produção de nanopartículas de prata (VELMURUGAN et al. 2014) e ouro (HE et al, 2007). Basicamente, o processo de formação começa com a transferência de elétrons transportados pelo NADH para os íons metálicos através da nitrato-redutase, ocorrendo o processo de redução e conseqüentemente crescimento das nanopartículas. Esse processo é regulado pela presença de nitrito ou nitrato no meio, sendo esses os compostos ativadores da nitrato-redutase. A expressão dos genes envolvidos na ativação da enzima é insensível ao oxigênio ( $O_2$ ), mas é induzida pela presença de nitrato e nitrito e reprimida na presença de amônio (GONZÁLEZ et al., 2006). Tais enzimas diferem das nitrato-redutases respiratórias, que são negativamente reguladas pela presença de oxigênio ( $O_2$ ), mesmo em presença de nitrato (GONZÁLEZ et al., 2006).

### **1.2.2 Estabilidade de nanopartículas metálicas**

Uma vez formadas, as nanopartículas metálicas são muito instáveis, podendo voltar à condição do material de origem em pouco tempo. Em decorrência de sua grande área superficial, as nanopartículas apresentam alta tendência de se agregarem para minimizar a energia total ou interfacial do sistema. Para se evitar a agregação das partículas, forças repulsivas devem se sobrepôr às atrativas (JIANG et al., 2009). A estabilidade pode ser conseguida pela repulsão estérica ou eletrostática. Alguns compostos são bastante utilizados durante o processo de síntese de nanopartículas metálicas, garantindo alto grau de estabilidade. Dentre esses compostos, mencionam-se os polímeros polivinilpirrolidona (PVP) (YU et al, 2009) e polietilenoglicol (PEG) (SHAMELI et al., 2012).

A estabilização estérica é conseguida pela adsorção de um composto não-carregado, como por exemplo algumas substâncias derivadas do metabolismo microbiano, que podem agir tanto como redutores quanto estabilizadores, impedindo a agregação e a oxidação de nanopartículas. Os biossurfactantes se enquadram nesse grupo, sendo excelentes biocompostos estabilizantes. SIGH et al. (2014) demonstraram a eficiência do ramnolípido na síntese e conservação de nanopartículas de zinco, o qual conferiu estabilização estérica pela formação de micelas envolvendo as nanopartículas, impedindo a agregação

### 1.2.3. Nanopartículas como agentes antimicrobianos

As nanopartículas têm sido avaliadas quanto às suas propriedades antimicrobianas sobre uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias de vários gêneros e fungos fitopatogênicos (KIM et al., 2012; OUDA, 2014; VELMURUGAN et al., 2014; ABBASZADEGAN et al., 2015). A resposta inibitória sobre microrganismos depende de uma série de fatores, como morfologia e tamanho da nanopartícula e sensibilidade do microrganismo (DURÁN, et al, 2016).

Diferentemente dos antibióticos e fungicidas convencionais, as nanopartículas, como as de prata e cobre, não exibem apenas um mecanismo de ação sobre a célula, o que é desejável pelo fato de tornar mais difícil a aquisição de resistência pelo microrganismo alvo. As nanopartículas de prata, por exemplo, agem por meio de diversos mecanismos, levando à alteração da morfologia da célula, à inativação de enzimas e proteínas, à inibição da replicação do DNA, à geração de espécies reativas de oxigênio e à interrupção de sinais bioquímicos no citoplasma (SINGH, et al, 2015; DURÁN, et al, 2016).

Comparativamente às nanopartículas de prata, as de cobre e óxido de cobre têm ganhado atenção, dada a sua eficácia como agentes antimicrobianos (OUDA, 2014; SHEND et al, 2015) e ao baixo custo, sendo sua matéria prima até dez vezes mais barata do que a prata (NARAYANAN et al, 2010). As nanopartículas de cobre e óxido de cobre também atuam por meio de diversos mecanismos dentro e fora da célula, incluindo a interação com grupos sulfidrila de proteínas, inativando-as, desbalanço do potencial eletroquímico na célula, alteração da integridade de membranas e geração de espécies reativas de oxigênio (SHEND et al, 2015).

O controle de fungos fitopatogênicos de diversos gêneros por nanopartículas de prata e cobre tem sido avaliado tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KIM et al., 2012; KANHED et al, 2014; OUDA, 2014). Os resultados promissores até então reportados estimulam o desenvolvimento de mais estudos com esses nanomateriais, de modo a aumentar a eficiência desses compostos e diminuir os problemas ambientais decorrentes de sua síntese a partir de substratos tóxicos e de custo elevado.

Em síntese, esse estudo visou à produção e utilização de compostos alternativos, com baixo risco ambiental e baixa toxicidade a humanos e animais, para utilização no manejo de doenças de plantas como a ferrugem asiática da soja, mofo branco e mofo cinzento.

### 1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASZADEGAN A., GHAHRAMANI Y., GHOLAMI A., HEMMATEENEJAD B., DOROSTKAR S., NABAVIZADEH M. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, p. 1-8, 2015.
- AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2009.
- ALVAREZ, F.; CASTRO, M.; PRINCIPE, A.; BORIOLI, G.; FISCHER, S.; MORI, G.; JOFRE, E. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 159–174, 2011.
- BAĆMAGA, M., KUCHARSKI, J., WYSZKOWSKA, J. Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with azoxystrobin. **Environment Monitoring and Assessment**, v.183, n. 10, p. 615, 2015.
- BARBOSA, P. (Ed.). Pesticides and conservation of natural enemies. In: Conservation biological control. New York, NY: **Academic press**, p. 207-2017, 1998 .
- BENGTSSON, T.; HOLEFORS, A.; LILJEROTH, E.; HULTBERG, M.; ANDREASSON, E. Biosurfactants Have the Potential to Induce Defence Against *Phytophthora infestans* in Potato. **Potato Research**, v. 58, p. 83–90, 2015.
- BONACIN, J. A. Sistemas Supramoleculares e Nanodispositivos Baseados em Complexos Terpiridínicos . Tese (Doutorado). Instituto de química Universidade de São paulo, São Paulo, 179 p., 2007
- BORAH, S. N.; GOSWAMI D.; SARMA H. K.; CAMEOTRA, S. S.; DEKA, S. Rhamnolipid Biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to Control Stalk and Ear Rot Disease of Maize. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, n. 1, p. 1-10, 2016.
- BOROWIK, A.; WYSZKOWSKA, J.; KUCHARSKI, J.; BAĆMAGA, M.; TOMKIEL, M. Response of microorganisms and enzymes to soil contamination with a mixture of terbuthylazine, mesotrione, and S-metolachlor. **Environment Science Pollution**, v. 24, p. 1910–1925, 2017.

- CASTRO-LONGORIA, E.; VILCHIS-NESTOR, A. R.; AVALOS-BORJA, M. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Colloids Surface**, v. 83, p. 42–48, 2011.
- CARVALHO DE MIRANDA, A. Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, 2007.
- CHAGAS, F.; POLONIO, J. C.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C.; PAMPHILE, J. A.; CONTE, H. Controle biológico em sistema orgânico de produção por agricultores da cidade de Maringá. **Ciência e Natura**, v. 38, p. 637-647, 2016.
- CHEIRMADURAI, K., BISWAS, S., MURALI, R., THANIKAIVELAN, P. Green synthesis of copper nanoparticles and conducting nanobiocomposites using plant and animal sources. **RSC Advances**, V. 4, p. 19507–19511, 2014.
- CONAB: 8º Levantamento - Safra 2016/2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acessado em 15/06/2017.
- CUEVAS, N.; DURÁN, M.; DIEZ, C.; TORTELLA, G. R.; RUBILAR, O. Extracellular biosynthesis of copper and copper oxide nanoparticles by *Stereum hirsutum*, a native white-rot fungus from chilean forests. **Journal of Nanomaterials**, p. 1–7, 2015.
- D'AES, J.; DE MAEYER, K.; PAUWELYN E.; HÖFTE M. Biosurfactants in plant–*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 3, p. 359–372, 2010.
- DEEPAK, V., KALISHWARALAL, K., Metal Nanoparticles in Microbiology. **Methods in Nanoparticles Microbiology**, p. 17–36, 2011.
- DEEPIKA, K. V.; RAGHURAM M.; BRAMHACHARIP. V. Rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain KVD-HR42 isolated from oil contaminated mangrove sediments. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 6, p. 218-231, 2017.
- DESAI, J. D.; BANAT, I.M.; Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 61, p. 47, 1997.
- DANG, T.M.D., LE, T.T.T., FRIBOURG-BLANC, E., DANG, M.C. Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method. **Nanoscience and Nanotechnology**, v.2, p. 1-6, 2011

- DURÁN, N., MARCATO, P.D., DURÁN, M., YADAV, A., GADE, A., RAI, M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. **Appl. Microbiol. Biotechnology**, v.90 n. 5, p. 1609-1624, 2011.
- DURÁN, N.; DURÁN, M.; JESUS, M.B.; SEABRA, A.B.; FÁVARO, W.J.; NAKAZATO, G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine**, v. 12, n. 3, p. 789-799, 2016
- FARIAS, C.B.B., SILVA, A.F., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SOUZA, J.E.G., SARUBBO, L.A. Synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant produced in low-cost medium as stabilizing agent. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 3, p.122–125, 2014
- FREESTONE, I.; MEEKS, N.; SAX, M.; HIGGITT, M. The Lycurgus Cup – A Roman Nanotechnology. **Gold Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 207-277, 2007.
- GADD, G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. **Microbiology**, v. 156, p. 609–643, 2010.
- GOND, S. K.; BERGEN, M. S.; TORRES, M. S.; WHITE JR, J. F. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. **Microbiological Research**, v. 172, p. 79–87, 2015.
- GONZÁLEZ, P.J., CORREIA, C., MOURA, I., BRONDINO, C.D., MOURA, J.J.G. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 5, p. 1015-1023, 2006.
- GUO, Q.; DONG, W.; LI, S.; LU, X.; WANG, P.; ZHANG, X.; WANG, Y.; MA, P. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. **Microbiological Research**, v. 169, p. 533–540, 2014.
- HE, S.; GUO, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, S.; WANG, J.; GU, N. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodospseudomonas capsulata*. **Materials Letters**, v. 61, p. 3984–3987, 2007.
- HUANG T, XU N. Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy. **Journal of Material Chemistry**, v. 20, p. 9867–9876, 2010.

- HULTBERG, M.; ALSBERG, T.; KHALIL, S.; ALSANIUS, B. Suppression of disease in tomato infected by *Pythium ultimum* with a biosurfactant produced by *Pseudomonas koreensis*. **BioControl**, v. 55, p. 435–444, 2010.
- IBGE: Estatística da Produção Agrícola maio de 2017. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Acessado em 15/06/2017.
- IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, p 2638-2650, 2011.
- JO, Y.-K., KIM, B. H., AND JUNG, G. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. **Plant Disease**. 2009, 93:1037-1043.
- JOSHI S.; BHARUCHA, C.; A. DESAI, J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4603–4608, 2008.
- JOURDAN, E.; HENRY G.; DUBY F.; DOMMES J.; BARTHELEMY J. P.; THONART P, ONGENA, M. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant Microbe Interact**, v. 22, p. 456-468, 2009.
- KANHED, P.; BIRLA, S.; GAIKWAD, S., GADE, A.; AMEDEA B. In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi. **Materials Letters**, v. 115, p.13–17, 2014.
- KIM, S. W.; JUNG, J. H.; LAMSAL, K.; KIM, Y.S.; MIN, J. S; LEE, Y. S. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. **Micobiology**, v. 40, p. 53-58.
- KIRAN, G.S., SELVIN, J., MANILAL, A., SUJITH, S. Biosurfactants are green stabilizers for the biological synthesis of nanoparticles. **Criticals Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 354-364, 2011.
- KOBAYASHI, Y.; SHIROCHI, T.; YASUDA, Y & MORITA, T. Synthesis of silver/cooper nanoparticles and their metal-metal bonding property. **Journal of Mining Metall**, v. 49, p. 65-70, 2013.
- KREMEN, C., & MILES, A. Ecosystem services in biologically diversified versus

- conventional farming systems: benefits, externalities, and trade-offs. **Ecology and Society**, v. 17, n. 4, 40 p, 2012.
- LANNA FILHO, R.; FERRO, H.M.; PINHO, R.S.C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v.4, n.2, p.12-20, 2010.
- LIZ-MARZÁN, L.M. Nanometals: Formation and color. *Materials*. **Today**, v. 7, n. 2, p.26–31, 2004.
- LOPES, A. S.; DAHER, E. Agronegócio e recursos naturais no cerrado: desafios para uma coexistência harmônica. In: *Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 173-209, 2008.
- MADAIL, J. C. M.; BELARMINO, L. C.; BINI, D. A. Evolução da produção e mercado de produtos orgânicos no Brasil e no mundo. **Revista Científica da AJES**, v. 2, n. 3, 2011.
- MAGET-DANA, R.; THIMON, L.; PEYPOUX, F.; PTAK, M. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on biological properties of iturin A. **Biochimie**, v.74, p. 1047-1051, 1992.
- MELO JR., M. A. S. S. SANTOS, M. C. GONÇALVES, A. F. NOGUEIRA. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v.35, n. 9, p.1872-1878, 2012.
- MIRANDA, A. C.; JOSINO, M. C.; RENÉ, C.; PERES, F. Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 7-14, 2007.
- NARAYANAN, K.B., SAKTHIVEL, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv. Colloid Interface Science*, v.156, n.1, p. 1-13, 2010.
- NITSCHKE, M. & PASTORE, M. G., Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.
- OLIVEIRA, M. R., MAGRI, A.; BALDO, C. Sophorolipids: A Promising Biosurfactant and its Applications. **International Journal of Advanced Biotechnology and**

- Research**, v. 6, n. 2, p. 161–174, 2015.
- ONGENA, M., and JACQUES, P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, n. 16, p.115–125, 2008.
- ONGENA, M., JOURDAN, E., ADAM, A., PAQUOT, M., BRANS, A., JORIS, B., et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environment Microbiology**, n.9 p. 1084–1090, 2007
- OUDA, M. S. Antifungal Activity of Silver and Copper Nanoparticles on Two Plant Pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. **Research Journal of Microbiology**, n. 9, p. 34-42, 2014.
- PANIGRAHI, S., KUNDU, S., GHOSH, S.K., NATH, S., PRAHARAJ, S., BASU, S., PAL, T. Selective one-pot synthesis of copper nanorods under surfactantless condition. **Polyhedron**, v. 25, n. 5, p. 1263–1269, 2006.
- PANDIAN, S.R.K.; DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; VISWANATHAN, P.; GURUNATHAN S. Mechanism of bactericidal activity of silver nitrate – a concentration dependent bi-functional molecule. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 805–809, 2010.
- PEREZ-GARCIA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 187-193, 2011.
- PERNEEL, M.; D'HONDT, L.; DE MAEYER, K.; ADIOBO, A.; RABAEY, K.; HÖFTE M. Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp. **Environment Microbiology**, v.10, n. 3, p. 778-88, 2008.
- PYOUNG II, K.; RYU, J.; KIM, Y. H.; CHI, Y. Production of biosurfactantes lipopeptides iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 138-145, 2010.
- RAAIJMAKERS, J. M.; BRUIJN, I.; NYBROE, O.; ONGENA, M: Natural functions of lipopeptides from Bacillus and Pseudomonas: more than surfactants and antibiotics. **FEMS Microbiology Review**, v. 34, p. 1037-1062, 2010.

- SAIFUDDIN, N., WONG, C.W., YASUMIRA, A.A.N. Rapid Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatant of Bacteria with Microwave Irradiation. **E-Journal of Chemmistry**, v. 6, n. 1, p. 61–70, 2009.
- SEIBER J.N.& KLEINSCHMIDT L.A. Contribution of pesticide residue chemistry to improving food and environmental safety: past and present accomplishments and future challenges. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v.59, p.7536–7543, 2011.
- SHENDE, S.;Ingle, A. P.; GADE, A.; RAI, M. • Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus medica* Linn. (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 865–873, 2015.
- SINGH B. N.; RAWAT A.K.S.; KHAN, W.; NAQVI, A.H.; SINGH, B.R. Biosynthesis of Stable Antioxidant ZnO Nanoparticles by *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.
- SINGH, R., SHEDBALKAR, U.U., WADHWANI, S.A., CHOPADE, B.A. Bacteriagenic silver nanoparticles: synthesis , mechanism , and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n.11, p. 4579-4593, 2015.
- SINDIVEG: Setor de defensivos agrícolas registra queda nas vendas em 2016. Disponível em: <http://sindiveg.org.br>. Acessado em 15/06/2017.
- TIQUIA-ARASHIRO, S., RODRIGUES, D. Nanoparticles Synthesized by Microorganisms. In: Extremophiles: Applications in Nanotechnology. **Springer**, p. 1-51, 2016.
- THE HISTORY BLOG: Lycurgus Cup inspires cool new sensor technology. Disponível em: <http://www.thehistoryblog.com/archives/26724>. Acessado em 23/08/2017.
- TRAN, H., Ficke, A., ASIIMWE, T., HOFTE, M., and RAAIJMAKERS, J.M. Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. **New Phytopathology**, n. 175 p.731–742, 2007.
- VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; JULIATTI, F.C. Manejo integrado e medidas de controle. In: VALE, F.X.R.; JESUS JUNIOR, W.C; ZAMBOLIM, L. Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas. Belo Horizonte: Editora Perfil, v. 1, p.463-526, 2004.

VARNIER, A.; SANCHEZ, L.; VATSA, P. & DOREY, S. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. **Plant Cell and Environment**, V.32, P. 178–193, 2009.

VELMURUGAN, P., IYDROOSE, M., MOHIDEEN, M.H.A.K., MOHAN, T.S., CHO, M., OH, B.T. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus subtilis* EWP-46 cell-free extract and evaluation of its antibacterial activity. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 37, n. 8, p. 1527-1534, 2014.

YU, W.; XIE, H.; CHEN, H.; LI, Y.; ZHANG, C. Synthesis and Characterization of Monodispersed Copper Colloids in Polar Solvents. **Nanoscale Letters**, v. 4 p. 465–470, 2009

## CAPÍTULO 2

### **PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS POR UM NOVO ISOLADO DE *Bacillus subtilis* (LBBMA AP 01)**

#### **2.1. RESUMO**

O objetivo desse estudo foi identificar e avaliar a produção de compostos antifúngicos por um novo isolado de *Bacillus subtilis* (LBBMA AP01). A ação antifúngica foi avaliada *in vitro*, cultivando-se o isolado bacteriano juntamente com escleródios do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* em TSA. O isolado foi cultivado em meio mineral a 200 rpm e 30 ° C e após 24 horas foi realizado teste de espalhamento de óleo para atestar a produção de biossurfactantes. O extrato bruto, obtido após precipitação ácida, foi submetido à Cromatografia em Camada Delgada (CCD), onde se avaliou qualitativamente a composição do extrato bruto com utilização de placas cromatográficas de sílica contendo padrões de surfactina, fengicina e iturina. O halo de espalhamento de óleo obtido com o sobrenadante da cultura em meio mineral e a atividade hemolítica da cultura em TSA adicionado de 5% de sangue de carneiro indicaram a produção de biossurfactantes por *B. subtilis* LBBMA AP01. O confronto em placas de Petri mostrou que o isolado inibe o crescimento do micélio de *S. sclerotiorum*. Em placas de CCD onde se aplicou o extrato metanólico do isolado *B. subtilis* LBBMA AP01, foram encontradas manchas com fatores de retenção semelhantes aos dos padrões dos lipopeptídeos surfactina, iturina e fengicina. Os resultados permitem concluir que o isolado *B. subtilis* LBBMA AP01 produz biossurfactantes ou outros compostos não identificados com atividade antifúngica contra *S. sclerotiorum*.

**Palavras chave:** *Bacillus subtilis* LBBMA AP01; *Sclerotinia sclerotiorum*; lipopeptídeos; biofungicida.

## 2.2. INTRODUÇÃO.

Biossurfactantes são um grupo diverso de compostos químicos tensoativos produzidos por uma grande variedade de microrganismos. Possuem a vantagem de serem compostos naturais e ambientalmente amigáveis, dada a sua rápida biodegradação e baixa toxicidade (DESAY & BANNAT, 1997). Esses compostos são aplicáveis a várias atividades humanas, a exemplo da recuperação melhorada de petróleo, da remediação de ambientes contaminados, na formulação de produtos cosméticos, farmacêuticos e fitossanitários, sendo reconhecidos por apresentarem ação antagônica contra microrganismos e, portanto, com potencial para uso em controle biológico (DESAY E BANNAT, 1997; ONGENA & JACQUES, 2008; MONTEIRO et al., 2013).

Nesse contexto, a produção de substâncias antagônicas por microrganismos apresenta-se como uma estratégia alternativa para a redução ou eliminação do uso de agroquímicos aplicados no controle de fitopatógenos. O grande potencial para implementação de técnicas de controle biológico baseia-se, em grande parte, na diversidade de microrganismos com atividade antagônica em relação a patógenos de importância agrícola (LANNA FILHO, et al., 2010), sendo muitas delas atribuídas a compostos inibidores, a exemplo dos biossurfactantes (ONGENA et al., 2007; CHEN et al., 2008; HULTBERG et al., 2010).

Dentre os microrganismos com potencial para uso no controle biológico de pragas e doenças em plantas, destaca-se o gênero *Bacillus*. Adicionalmente, membros desse gênero apresentam mecanismos de promoção de crescimento de plantas e consequentemente aumento de produtividade das culturas (ROMEIRO, et al.; 2005; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Espécies pertencentes a esse gênero têm grande parte do genoma dedicado à produção de substâncias antibióticas, que incluem mais de vinte e quatro compostos antimicrobianos diferentes. Vários desses compostos apresentam efeito inibidor contra diferentes espécies de fungos fitopatogênicos (OGENA & JACQUES, 2008; HULTBERG et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011; MONTEIRO et al.; 2013; BORAH et al., 2016).

A espécie *Bacillus subtilis* destaca-se como uma fonte de moléculas bioativas, incluindo os biossurfactantes. Dentre os biossurfactantes produzidos por *B. subtilis*, os mais estudados são os lipopeptídeos surfactina, iturina e fengicina (DESAI & BANATI

1997; PYOUNG II et al.; 2010), os quais são reconhecidos como candidatos potenciais para o desenvolvimento de novos produtos fitossanitários.

Considerando-se o histórico do gênero *Bacillus* como um gênero de produtores de compostos tenso-ativos com propriedades antimicrobianas, o objetivo desse estudo foi avaliar a produção de biossurfactantes por um novo isolado de *Bacillus subtilis* (LBBMA AP01), obtido em uma aula prática da disciplina Microbiologia Geral oferecida pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa. O potencial antifúngico dos compostos excretados por esse isolado contra o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* foi também avaliado.

## **2.3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.3.1. Isolamento e identificação do isolado *Bacillus subtilis* LBBMA AP01**

O isolado *Bacillus subtilis* LBBMA AP01 foi obtido a partir de uma placa de Petri contendo BDA (batata dextrose ágar), utilizada para isolamento de fungos fitopatogênicos em uma aula prática de Microbiologia Geral, oferecida pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa. O crescimento desse isolado na placa, como um contaminante, resultou na formação de um amplo halo de inibição de diferentes espécies de fungos que cresciam na placa. Para obtenção da cultura bacteriana pura do novo isolado, o mesmo foi repicado para placa de Petri contendo meio TSA (Tryptic Soy Agar, Difco, Maryland, EUA), seguindo-se incubação por cerca de 24 horas a 30°C. Uma vez em cultura pura, o isolado foi submetido à avaliação do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, Fatty Acid Methyl Ester) para identificação da espécie. Os FAME foram preparados utilizando-se o kit Instant Fame (MIDI Inc., Newark, DE), seguindo-se as recomendações do fabricante. A amostra foi injetada em um cromatógrafo a gás Agilent modelo 7890A e a análise feita pelo programa Sherlock Microbial Identification System (MIDI Inc., Newark, Delaware, USA), utilizando-se o método e a biblioteca ITSA 1.0.

### **2.3.2. Preservação do microrganismo**

Após a identificação, a cultura foi repicada para tubos contendo 2,5 ml de meio TSB (Tryptic Soy, Difco, Maryland, EUA), seguindo-se incubação a 30 °C e 200 rpm por cerca de 24 horas. A suspensão bacteriana (600 µl) foi transferida para criotubos contendo 400 µl de glicerol a 80% (v/v), os quais foram armazenados a -80 °C em ultrafreezer.

### **2.3.3. Observação do efeito antagônico do isolado *B. subtilis* LBBMA AP01 contra *Sclerotinia sclerotiorum***

O potencial antifúngico do isolado *B. subtilis* LBBMA AP01 foi avaliado utilizando-se a metodologia do confronto em placas. Placas de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Agar, Sigma Aldrich) foram inoculadas com o isolado *B. subtilis* LBBMA AP01, fazendo-se uma única estria no centro da placa. Dois escleródios do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, previamente obtidos pelo cultivo do fungo em placas de Petri contendo meio BDA, foram colocados próximos às bordas da placa em extremidades

opostas. Como controle, foi utilizada uma placa contendo escleródios do fungo sem a presença do isolado bacteriano. As placas foram incubadas a 25 °C por cerca de 120 horas. O ensaio foi conduzido com 3 repetições.

#### **2.3.4. Produção do extrato bruto contendo biossurfactantes pelo isolado *B. subtilis* LBBMA AP01**

A produção de biossurfactantes pelo isolado *B. subtilis* LBBMA AP01 foi avaliada por meio do teste de hemólise em placa e pelo teste de espalhamento de óleo (YOUSSEF et al., 2004).

Para o teste de hemólise, a cultura foi repicada em triplicata em placas contendo meio TSA adicionado de 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado, seguindo-se incubação a 30 °C por cerca de 48 horas. A presença de um halo transparente ao redor das colônias foi interpretada como indício da produção de biossurfactantes.

Para realização do teste de espalhamento de óleo, o isolado foi reativado em TSA a 30 °C por 24 horas e transferido para tubos de ensaio contendo 5 ml de caldo TSB (Tryptic Soy Broth, Difco, Maryland, EUA), seguindo-se incubação a 30 °C e 200 rpm por 24 horas. Uma alíquota da suspensão bacteriana (1 % v/v) foi transferida para um frasco tipo Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio mineral contendo (g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (13,9); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,7); NH<sub>4</sub>Cl (1,0); extrato de levedura (0,05); NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (1,0), suplementado após autoclavagem (121 °C, 20 minutos) com 40 ml solução estéril de glicose a 50 % (m/v) (concentração final: 20 g/L) e de micronutrientes (1,0 ml/L), contendo (g/L): EDTA (0,5); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (3,0); MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (0,5); NaCl (1,0); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,1); CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,1); ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,1); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,1); CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,1); Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,01); NaSeO<sub>4</sub> (0,01); Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,01); NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,02). Os frascos foram incubados a 30 °C e 200 rpm por cerca de 24 horas. O inóculo foi preparado por centrifugação da cultura a 12.000 g por 10 minutos e as células foram lavadas em solução de NaCl (0,85 %) duas vezes e ressuspensas na mesma solução. Frascos do tipo Erlenmeyer de 1,0 L contendo 500 ml do meio descrito acima foram inoculados com um volume de inóculo suficiente para se obter uma densidade óptica a 600 nm correspondente a 0,05. Os frascos foram incubados a 30 °C sob agitação constante de 200 rpm por 24 horas.

Durante o período de incubação, a cada 24 horas (até o período final de 96 h) foi feito o ensaio de espalhamento de óleo. Para isso, foram pipetados 30 µL de óleo bruto sobre a superfície de água destilada (100 mL) contida em uma placa de Petri de 150 x 20 mm de diâmetro, para formar uma fina camada de óleo. Em seguida um volume de 10 µL do sobrenadante da cultura foi adicionado sobre o centro da placa (YOUSSEF et al., 2004). O diâmetro do halo de espalhamento de óleo foi medido após 30 segundos.

Após 24 horas de incubação, a cultura foi centrifugada a 12.000 g por 20 minutos a 25 °C e o sobrenadante coletado e transferido para frascos tipo Scott. O extrato livre de células foi submetido à precipitação ácida, ajustando-se o pH para 2,0 com HCl 1 mol/L, seguindo-se armazenamento a 4 °C por 24 h. Após esse período, uma nova centrifugação foi realizada para recuperação do precipitado (12.000 g, 20 minutos, 4 °C). Os pellets foram ressuspensos em água destilada, ajustando-se o pH da solução para 7,0. A solução obtida foi submetida à liofilização e o extrato liofilizado foi armazenado a 4 °C.

### **2.3.5. Produção do extrato metanólico via extração por exaustão**

Em um frasco Erlenmeyer (250 mL) com tampa, foram adicionados 150 mL de metanol e 728 mg do extrato liofilizado do isolado *B. subtilis* LBBMA AP01, obtido conforme metodologia descrita acima. O material foi levado para agitação magnética por 24 horas. Após esse período, o extrato foi filtrado em papel de filtro quantitativo (faixa preta). O filtrado foi recolhido e levado a evaporador rotativo (38 °C), sendo obtido, ao final, o extrato metanólico.

### **2.3.6 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Para avaliar a presença de lipopeptídeos no extrato metanólico, foram utilizadas placas cromatográficas de sílica-gel de 4,0 x 2,5 cm, com indicador fluorescente F<sub>254</sub> (Sigma-Aldrich), contendo padrões de surfactina, iturina A e fengicina A (Sigma-Aldrich). As soluções-estoque desses padrões foram preparadas na concentração de 10,0 mg/ml utilizando álcool etílico absoluto. As soluções-estoque foram diluídas e utilizadas na concentração de 0,1 mg/ml. Os extratos metanólicos obtidos do material liofilizado do isolado *B. subtilis* LBBMA AP01 foram aplicados na concentração de 1,0 mg/ml. As amostras foram introduzidas nas placas de CCD utilizando capilares de vidro, sendo realizadas cerca de 50 aplicações por amostra. As placas foram eluídas com a fase móvel A, composta de clorofórmio:metanol:água – 65:25:4 (v/v). A revelação das placas de

CCD foi feita pulverizando uma solução alcoólica de ácido sulfúrico 15% (v/v), seguindo-se visualização das placas em câmara de luz ultravioleta ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ).

## **2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

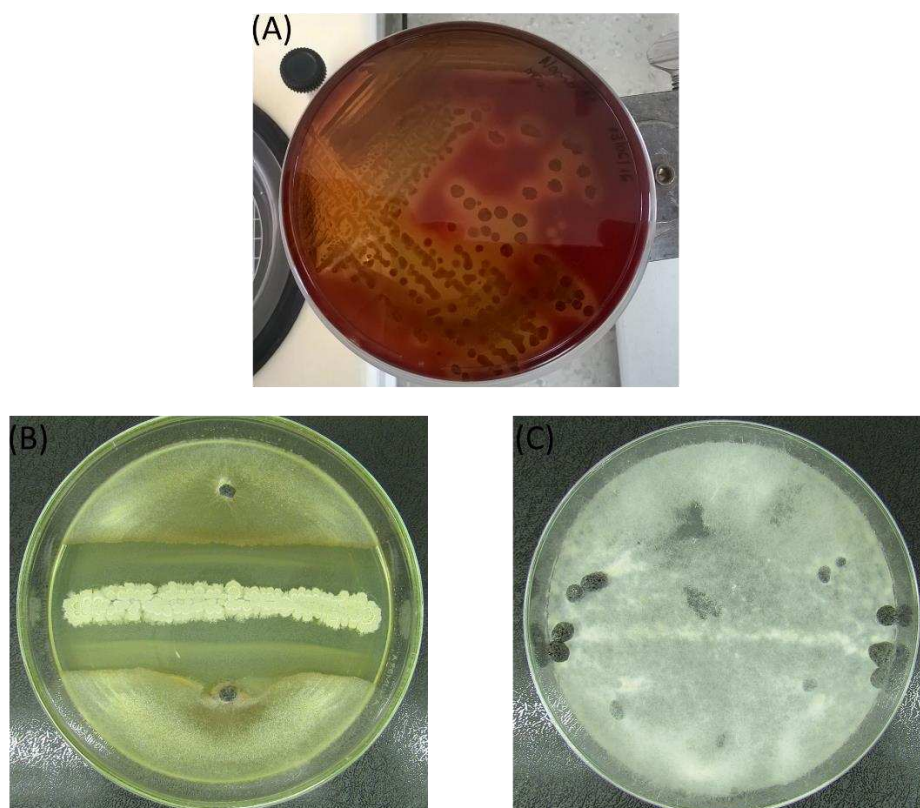
### **2.4.1. Identificação do microrganismo**

A análise do perfil de ácidos graxos de *B. subtilis* LBBMA AP01 pelo sistema Sherlock Microbial Identification System (MIDI Inc., USA) revelou que o isolado pertence à espécie *Bacillus subtilis*, com índice de similaridade de 0,886 para *Bacillus subtilis* subgrupo *D* da biblioteca de referência ITSA 1.0.

### **2.4.2. Avaliação da produção de biossurfactantes e do potencial de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinea sclerotiorum* pelo isolado *B. subtilis* LBBMA AP01**

O teste de hemólise revelou a presença de halos no entorno das colônias à medida que o isolado se desenvolvia (Figura 2.1 A). Segundo YOUSSEF et al. (2004), esse teste é considerado uma seleção primária de organismos produtores de biossurfactantes, mas pode omitir microrganismos produtores desses compostos, visto que o mecanismo de hemólise está diretamente relacionado com a estrutura do tensoativo. O resultado obtido com o isolado *B. subtilis* LBBMA AP01 é indicativo da produção de biossurfactantes.

O cultivo de *B. subtilis* LBBMA AP01 juntamente com *Sclerotinea sclerotiorum* inibiu o desenvolvimento do fungo (Figura 2.1 B e C). O resultado é um indicativo da produção de compostos antagônicos, indicando o potencial de *B. subtilis* LBBMA AP01 para a utilização como biofungicida no controle do mofo branco. RAHMAN et al. (2016) obtiveram resultados similares ao aqui reportado ao trabalharem com isolados de *B. subtilis* oriundos de solo rizosférico.



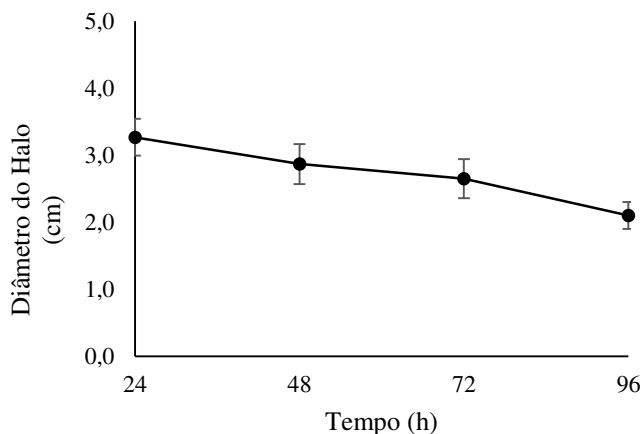
**Figura 2.1:** (A) Potencial hemolítico de *Bacillus subtilis* LBBMA AP01 em TSA-sangue, indicativo da produção de biossurfactantes; (B) *B. subtilis* LBBMA AP01 cultivado juntamente com *Sclerotinia sclerotiorum*, onde se observa a inibição do crescimento micelial do fungo na região de crescimento do isolado bacteriano; (C) *S. sclerotiorum* cultivado na ausência de *B. subtilis* LBBMA AP01.

#### 2.4.3. Produção do extrato bruto de biossurfactantes por *B. subtilis* LBBMA AP 01

Durante o período de incubação, a cultura de *B. subtilis* LBBMA AP01 foi submetida ao teste de espalhamento em óleo, tendo sido observada a formação do halo característico de espalhamento resultante da adição de surfactantes sobre a superfície do óleo. Em média, foram observados halos com diâmetro aproximado de  $3,2 \text{ cm} \pm 0,28$  nas amostras coletadas com 24 horas de incubação. Após 24 horas de incubação, houve um decréscimo gradual do diâmetro dos halos de espalhamento (figura 2.2), indicando uma redução da concentração de biossurfactantes na cultura.

A diminuição da concentração de compostos tenso-ativos produzidos por microrganismos pode ser explicada pelo esgotamento de sua fonte primária de carbono, nesse caso a glicose, utilizada para crescimento de *B. subtilis* LBBMA AP01. De acordo com SHALIGRAM & SINGHAL (2010), a partir do ponto em que a fonte primária de

carbono se esgota, os microrganismos podem utilizar os próprios biossurfactantes para suprir a deficiência de carbono no meio, através da produção de proteases capazes de degradar lipopeptídeos, principalmente a surfactina.



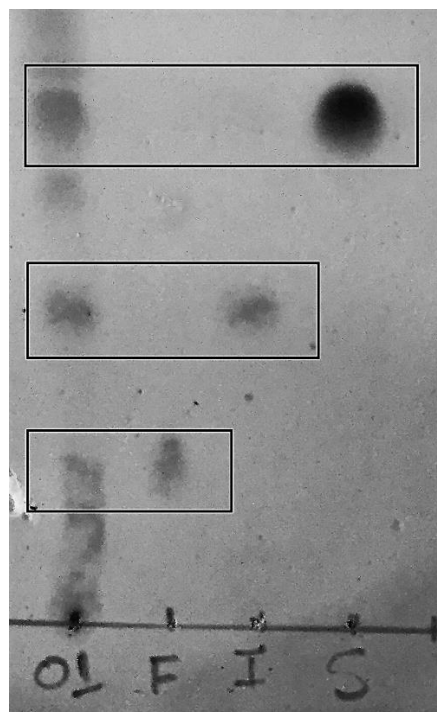
**Figura 2.2:** Diâmetro do halo de espalhamento de óleo ao longo de 96 horas de cultivo de *B. subtilis* LBBMA AP01 a 30 °C e 200 RPM em meio mineral contendo glicose a 20 g/L como fonte de carbono. Observa-se um decréscimo significativo (teste de Tukey a 5 % de probabilidade) no diâmetro dos halos de espalhamento a partir de 24 horas de incubação.

A partir da precipitação ácida da cultura de *B. subtilis* LBBMA AP01 após 96 horas de incubação, seguida de liofilização, foram obtidos 520 mg de extrato bruto liofilizado por litro de sobrenadante livre de células. No total, foram obtidos 780 mg de extrato liofilizado.

#### **2.4.4. Avaliação da presença de lipopeptídeos no extrato bruto liofilizado de *B. subtilis* LBBMA AP01 por cromatografia em camada delgada (CCD)**

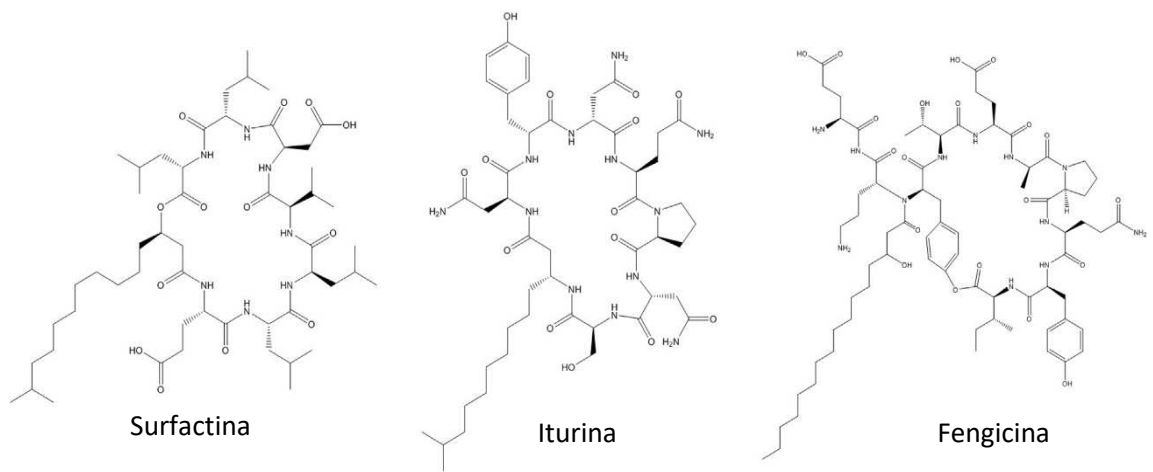
A partir dos 780 mg de extrato bruto liofilizado de *B. subtilis* LBBMA AP01, foram obtidos 450 mg de extrato metanólico. O extrato metanólico foi submetido a uma análise por CCD para se determinar a possível presença de biossurfactantes das classes das surfactinas, iturinas e fengicinas, de acordo com os padrões disponíveis no laboratório. Após a revelação das placas, foram encontradas manchas com valores de Rf (“retention factor”, ou fator de retenção) semelhantes aos valores dos padrões de

surfactina, iturina e fengicina, indicando a produção de todas essas classes de lipopeptídeos por *B. subtilis* LBBMA AP01 (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Placa de CCD contendo o extrato metanólico de *B. subtilis* LBBMA AP01. Fengicina (F)  $R_f = 0,23$ ; iturina (I)  $R_f = 0,47$  e surfactina (S)  $R_f = 0,77$ . Fase móvel clorofórmio:metanol:água – 65:25:4. Revelador: ácido sulfúrico a 15% (v/v) em etanol, seguido de aquecimento com soprador térmico.

Em geral, lipopeptídeos cíclicos são moléculas anfipáticas, que possuem em sua estrutura uma cadeia linear carbônica (parte lipídica hidrofóbica, com pequenas variações no tamanho e na composição), conectada a um peptídeo cíclico formado pela ligação entre vários aminoácidos (parte peptídica hidrofílica, com algumas variações entre os aminoácidos) (HAMLEY, 2015). Os lipopeptídeos cíclicos das famílias das surfactinas, iturinas e fengicinas (Figura 2.4) são frequentemente encontrados como produtos do metabolismo secundário em culturas de *B. subtilis* (HAMLEY, 2015; GEISLER et al., 2017). Conforme pôde ser observado pela análise por CCD, foi possível confirmar a presença de moléculas dessas famílias na amostra originada do cultivo de *B. subtilis* LBBMA AP01.



**Figura 2.4.** Exemplos de moléculas das principais famílias de lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis*, encontradas também no extrato da cultura de *B. subtilis* LBBMA AP01. (Adaptado de GEISSLER et al., 2017).

## 2.5. CONCLUSÕES

O isolado *B. subtilis* LBBMA AP01 demonstrou capacidade de produção de compostos tenso-ativos, caracterizados como pertencentes à classe dos lipopeptídeos surfactina, iturina e fengicina. LBBMA AP01 apresentou efeito antagônico contra o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Como perspectiva futura, após a etapa primária de fracionamento do extrato metanólico de *B. subtilis* LBBMA AP01, novos fracionamentos, utilizando cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa, deverão ser realizados, com a finalidade de se obterem moléculas puras dos biosurfactantes para confirmar sua identidade e avaliar o efeito de cada lipopeptídeo, separadamente e em combinações, sobre o fitopatógeno usado como modelo nesse estudo e outros fungos causadores de doenças em plantas. Nessa fase, deverão ser determinadas, ainda, as concentrações inibitórias mínimas de cada um dos compostos e de suas combinações.

## 2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORAH, S. N.; GOSWAMI D.; SARMA H. K.; CAMEOTRA, S. S.; DEKA, S. Rhamnolipid Biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to Control Stalk and Ear Rot Disease of Maize. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, n. 1, p. 1-10, 2016.
- CHEN, H.; WANG, L.; SU, C. X.; GONG, G. H.; WANG, P.; YU, Z. L. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology**, n. 47, p. 180-186, 2008.
- DESAI, J. D.; BANAT, I.M.; Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.61, p. 47-64, 1997.
- GEISSLER, M.; OELLIG, C.; MOSS,K.; SCHWACK,W.; HENKELA,M.; HAUSMANN, R. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) for the simultaneous quantification of the cyclic lipopeptides Surfactin, Iturin A and Fengycin in culture samples of *Bacillus* species. **Journal of Chromatography**, p. 1044–1045, 2017.
- HAMLEY, I. W. Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. **Chemistry Communities**, v. 51, p. 8574—8583, 2015.
- HULTBERG, M.; ALSBERG, T.; KHALIL, S.; ALSANIUS, B. Suppression of disease in tomato infected by *Pythium ultimum* with a biosurfactant produced by *Pseudomonas koreensis*. **BioControl**, v. 55, p. 435–444, 2010.
- MONTEIRO, F. P.; FERREIRA, L. C.; PACHECO, L. P.; SOUZA, P.E. Antagonism of *Bacillus subtilis* against *Sclerotinia sclerotiorum* on *Lactuca sativa*. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 4, p. 214-223, 2013.
- ONGENA, M., JOURDAN, E., ADAM, A., PAQUOT, M., BRANS, A., JORIS, B., et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environment Microbiology**, n.9, p. 1084–1090, 2007.
- ONGENA, M., and JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends Microbiology** n. 16, p.115–125, 2008.
- PEREZ-GARCIA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 187-193, 2011.

- PYOUNG II, K.; RYU, J.; KIM, Y. H.; CHI, Y. Production of biosurfactantes lipopeptides iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 138-145, 2010.
- RAHMAN, A.A.; HOSSAIN, D. M.; SUZUKI, K.; SHIYA, A.; DEY, T. K.; NONAKA, M.; HARADA, N. Supressive efect of Bacillus spp. On mycelia, apothecia anda sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potencial as biological control of whit mold on mustard. **Australian Plant Pathology**, v. 45, p. 103-117, 2016.
- ROMEIRO, R.S.; LANNA-FILHO, R.; VIEIRA, J.R.; SILVA, H.S.A.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; CARVALHO, M.G. Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. **Journal of Phytopathology**, v.153, p.120-123. 2005.
- SHALIGRAM, N.S. & SINGHAL, R.S. Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications Food Technology. **Biotechnology**, v.48, n. 2, p. 119–134, 2010
- YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; McINERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 339–347, 2004.

### CAPÍTULO 3

## **BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E COBRE UTILIZANDO GLICOSE E EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS DE *Bacillus subtilis* MV 126P**

### **3.1. RESUMO**

Nanopartículas são compostos de dimensões submicrométricas com propriedades superiores e diferenciadas em relação ao material de que se originam. Existem diversas metodologias para a síntese de nanopartículas metálicas. A tendência nos últimos anos é a utilização da redução química com compostos redutores alternativos, como extratos microbianos e de plantas e outros materiais inócuos, como glicose e sacarose, dados a sua biocompatibilidade, o baixo custo e a redução da toxicidade. Nesse trabalho, foram utilizados o sobrenadante da cultura de *Bacillus subtilis* isolado MV 126P e glicose para a biossíntese de nanopartículas de prata e cobre. As nanopartículas produzidas foram caracterizadas por espectrofotometria UV-VIS, Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), Microscopia de Força Atômica (AFM) e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e avaliadas quanto à estabilidade. Foram obtidas nanopartículas de prata e cobre esféricas com tamanhos variáveis quando se utilizou glicose como agente redutor. O extrato de *B. subtilis* foi eficiente como agente catalisador da síntese de nanopartículas de prata, também esféricas e de caráter polidisperso, mas não de cobre. As nanopartículas se mantiveram estáveis por longo período de tempo com a adição de ramnolípido como agente estabilizante, mas se mostraram bastante instáveis na ausência de ramnolípido.

**Palavras chave:** nanopartículas de prata e cobre; biorredução; sobrenadante bacteriano, ramnolípido; “green chemistry”.

### 3.2. INTRODUÇÃO

Materiais em escala nanométrica podem ser definidos como partículas de tamanho variando de 1 a 1.000 nm de diâmetro (KIRAN et al., 2011). As nanopartículas metálicas, em particular as de ouro e de prata, têm recebido grande interesse em decorrência de suas amplas aplicabilidades (WEI et al., 2015). As nanopartículas de prata constituem a categoria de nanomateriais mais comercializada atualmente, com aplicações em vários produtos, como em embalagens antimicrobianas, equipamentos da área médica, dispositivos de diagnóstico molecular, sensores, têxteis, purificadores de água, cosméticos e eletrônicos (SINGH et al., 2015).

Cobre metálico exibe um amplo espectro de atividade antimicrobiana (CUEVAS, et al, 2015). Em contraste com as nanopartículas de prata, as quais têm sido extensivamente estudadas em razão de suas propriedades antimicrobianas, as nanopartículas de cobre e de óxido de cobre ainda requerem estudos mais aprofundados, mas começam a ganhar importância em decorrência de seu amplo espectro de atividade e potencial biocida (CUEVAS, et al., 2015).

Uma grande variedade de metodologias têm sido descritas para a síntese e caracterização de nanopartículas, podendo as mesmas serem classificadas em metodologias de síntese química (ROLDÁN et al., 2013; SOTIRIOU & PRATSINIS, 201& et al., 2011), física (ASANITHI et al., 201&et al., 2008) ou biológica ARASHIRO & VELMURUGAN et al., 2014; GURUNATHAN et al., 2009). Os métodos de síntese de nanopartículas baseados no uso de extratos vegetais (CHEIRMADURAI et al., 2014), produtos do metabolismo microbiano, como biossurfactantes (FARIAS et al., 2014), extratos livres de células de culturas bacterianas (GURUNATHAN et al., 2009) e açúcares redutores, como a glicose (PANIGRAHI et al., 2006), têm recebido especial destaque em relação aos métodos químicos e físicos convencionais, em decorrência do uso de substratos biocompatíveis, atóxicos ou de baixa toxicidade e da simplicidade do processo de produção (SINGH et al., 2015). Adicionalmente, as biomoléculas podem atuar também como estabilizadores, prevenindo a agregação das nanopartículas, aumentando com isso a sua estabilidade (TIQUIA-ARASHIRO & RODRIGUES, 2016; SINGH et al., 2015).

Uma grande variedade de microrganismos é conhecida pela capacidade de sintetizar nanopartículas. Contudo, a busca por novas linhagens aptas a realizarem a biossíntese de nanopartículas com características especiais de estabilidade, monodispersibilidade (uniformidade de tamanho) ou que apresentem morfologias e tamanhos singulares, é cada vez mais frequente nas pesquisas em nanotecnologia (ELBESHEHY et al., 2015). Adicionalmente, a adaptação das metodologias de síntese baseadas em extratos naturais, açúcares redutores e a estabilização das nanopartículas por agentes biológicos pode constituir estratégias valiosas para a obtenção de novas nanoestruturas com propriedades melhoradas.

Nesse estudo, foram realizados a biossíntese, a caracterização e o estudo da estabilidade de nanopartículas de prata (AgNPs) e cobre (CuNPs), utilizando-se extrato livre de células (sobrenadante) de uma cultura de *Bacillus subtilis* MV 126P ou glicose como agentes redutores e um biossurfactante (ramnolipídeo) como agente estabilizante das nanopartículas.

### **3.3. MATERIAL E MÉTODOS.**

#### **3.3.1. Microrganismo e condição de cultivo**

O microrganismo utilizado para a síntese das nanopartículas, *Bacillus subtilis* MV 126P, foi isolado a partir de amostra de solo coletada na Ilha de Martin Vaz– Brasil – e previamente identificado pelo sequenciamento do rDNA 16S. Para obtenção da cultura bacteriana, *B. subtilis* MV 126P foi reativado a partir do estoque a - 80 °C em TSA (Tryptic Soy Agar, Difco, Maryland, EUA) por 24 horas a 30 °C. O inóculo foi preparado repicando-se uma colônia para 5,0 mL de TSB (Tryptic Soy Broth, Difco, Maryland, EUA), seguindo-se incubação por 24 horas a 30°C e 200 rpm. Alíquotas correspondentes a 1 % (v/v) de inóculo foram transferidas para cinco frascos do tipo Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de TSB. Cada frasco foi incubado a 30 °C por 12, 18, 24, 36 ou 48 h, sob agitação constante de 200 rpm, para se avaliar o efeito da idade da cultura sobre a capacidade de redução das nanopartículas. O crescimento microbiano foi avaliado por meio da medição da densidade óptica da cultura por igual período de tempo. Este ensaio contou com 3 repetições.

#### **3.3.2. Síntese de nanopartículas de prata e cobre por *Bacillus subtilis* MV 126P**

A síntese de nanopartículas utilizando o extrato livre de células de *B. subtilis* MV 126P foi feita segundo os métodos descritos por GURUNATHAN et al. (2009) e VELMURUGAN et al. (2014), com adaptações. Após cada período de incubação, a cultura foi centrifugada a 9.000 g e o sobrenadante utilizado para síntese das nanopartículas. A síntese foi realizada em frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 5 mL do extrato livre de células, aos quais se adicionaram, separadamente, 20 mL de AgNO<sub>3</sub> (1,0 mmol/L) ou 20 ml de CuSO<sub>4</sub> (10 mmol/L). O pH foi ajustado para 10 utilizando-se NaOH 1,0 M e a mistura foi incubada a 60°C sob agitação constante de 200 rpm por 12 horas.

Controles negativos foram realizados utilizando-se TSB em substituição ao extrato livre de células ou somente as soluções de AgNO<sub>3</sub> ou CuSO<sub>4</sub>, nas mesmas concentrações utilizadas para a síntese das nanopartículas e sob as mesmas condições de incubação.

Os tratamentos foram conduzidos com três repetições para cada período de incubação da cultura, conforme descrito no item 3.1.

### **3.3.3. Síntese de nanopartículas de prata e cobre mediada por glicose**

A síntese de nanopartículas de prata e cobre por redução mediada por glicose foi realizada de acordo com o método descrito por PANIGRAHI et al. (2006), com adaptações. A síntese foi realizada em frascos tipo Erlenmeyer de 50 mL, aos quais foram adicionados sequencialmente 25 mL de água Mili-Q e 0,2 g de glicose (VETEC, São Paulo, Brasil). Após a dissolução completa da glicose, foram adicionados 50 µL de NaOH (1,0 mol/L), 1 mL de AgNO<sub>3</sub> nas concentrações de 100, 66, 50, 33, 25 e 20 mmol/L ou 1 ml de CuSO<sub>4</sub> a 10, 11,1, 12,5, 14,3, 16,6 e 20 mmol/L. As misturas foram incubadas sob agitação por 3 minutos a 80<sup>0</sup> C. A progressão da reação foi monitorada visualmente pela mudança de coloração das soluções.

### **3.3.4. Caracterização das nanopartículas de prata e cobre**

Para a caracterização, as nanopartículas foram submetidas a medidas de absorvância óptica, utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis (Multiskan GO, ThermoFisher Scientific) com escaneamento entre 200 e 700 nm e resolução de 1 nm. A presença de nanopartículas e a visualização morfológica foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e por microscopia de força atômica (AFM). Para a realização da TEM, uma gota de cada suspensão foi dispersa sobre um *grid* de cobre e visualizada diretamente ao microscópio eletrônico (EM 109, Zeiss). Para a execução da AFM, uma gota de cada suspensão foi espalhada sobre um suporte de mica e as medidas de topografia foram realizadas pelo modo de contato intermitente, utilizando-se microscópio de força atômica (NT-MDT, Ntegra Prima, Rússia).

A caracterização do formato e da distribuição do tamanho das nanopartículas foi realizada pela medida do espalhamento dinâmico de luz (DLS), utilizando-se um equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Southborough, UK).

Posteriormente à síntese e caracterização, as nanopartículas foram submetidas à liofilização e armazenagem a 4°C.

### 3.3.5. Avaliação da estabilidade das nanopartículas

Para se avaliar o efeito estabilizante e se determinar uma dose mínima de biossurfactante que garanta estabilidade e manutenção das propriedades das nanopartículas, as soluções de nanopartículas de prata e cobre foram tratadas com diferentes concentrações de uma mistura de mono (Rha-C10, 29 g/L) e di-ramnolipídeos (Rha-Rha-C10, 31,5 g/L) (Biossur, Brasil).

As nanopartículas de prata foram produzidas pelo método de redução química, utilizando-se glicose ou sobrenadante de *B. subtilis* MV 126P como agentes redutores. Nanopartículas de cobre foram produzidas usando-se apenas a glicose como agente redutor, já que o sobrenadante da cultura de *B. subtilis* MV 126P não se mostrou um catalisador eficiente para a síntese de nanopartículas desse metal. Alíquotas de 20 mL das soluções de nanopartículas recém-produzidas foram transferidas para tubos de ensaio, aos quais foram adicionados volumes da solução-estoque de ramnolipídeo (85 g/L) para se obterem concentrações equivalentes a 0; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 20; 40 e 60 vezes a sua concentração micelar crítica (CMC = 65 mg/L).

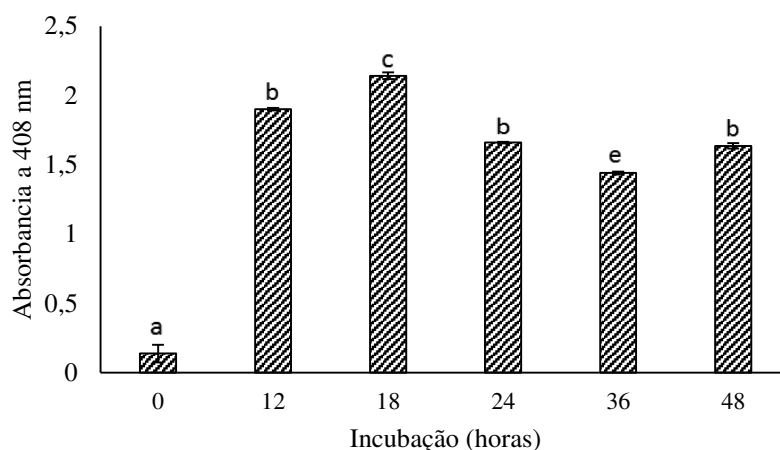
A estabilidade das nanopartículas foi avaliada pela medida dos picos de absorvância ao longo do tempo pelo escaneamento da absorvância no UV-VIS entre 200 e 700 nm e resolução de 1 nm. Nesse período de avaliação, as suspensões de nanopartículas foram mantidas estáticas em tubos de ensaio vedados com tampa rosqueada a 4,0 °C.

Os valores de máxima absorvância para cada tratamento (variando a concentração de ramnolipídeo) foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Assistat (SILVA et al, 2016).

### 3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1. Síntese e caracterização espectrofotométrica das nanopartículas de prata e cobre

O extrato livre de células obtido durante o cultivo do isolado *B. subtilis* MV 126P contém agentes redutores capazes de catalisar a síntese de nanopartículas de prata em todos os tratamentos onde se variou o período de incubação da cultura microbiana. Observou-se um maior valor de absorbância a 408 nm nas amostras contendo AgNPs sintetizadas com sobrenadante da cultura com 18 h de incubação (Figura 3.1), indicando a obtenção de maior concentração de nanopartículas. Após esse período de incubação, houve queda significativa na capacidade de síntese de AgNPs.

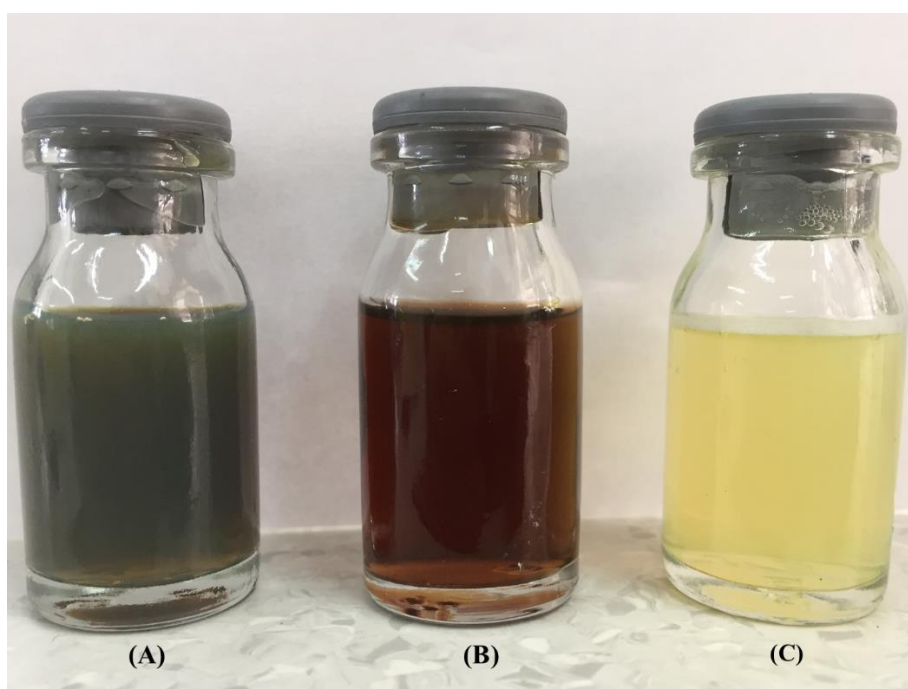


**Figura 3.1:** Análise espectrofotométrica de soluções contendo nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas com sobrenadante de *Bacillus subtilis* MV 126P retirado da cultura em diferentes períodos de incubação em caldo TSB, 30 °C e 200 rpm. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A varredura das soluções de nanopartículas na faixa de 200 a 700 nm indicou que as nanopartículas sintetizadas pelo método empregado nesse estudo apresentam pico de absorbância no comprimento de onda de 408 nm ( $\pm 2,7$  nm), sendo esse o valor reportado na figura acima como indicador da concentração de nanopartículas de prata em cada tratamento.

Decorrido um período inicial de 12 horas de incubação da mistura de síntese de nanopartículas, a solução adquiriu a coloração marrom característica da formação de AgNps sintetizadas com extrato microbiano (Figura 3.2 B).

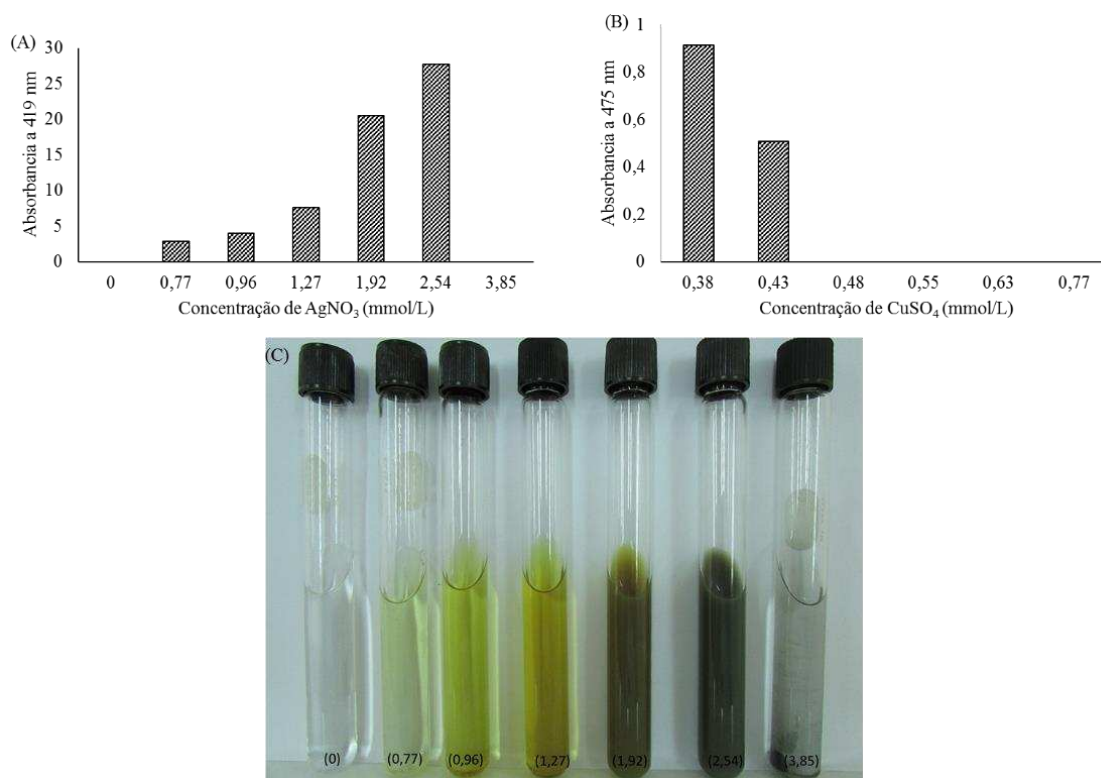
Não foram obtidas CuNPs com o sobrenadante do isolado *Bacillus subtilis* MV 126P como agente redutor, tendo sido obtidas soluções parcialmente incolores com um precipitado de coloração acinzentada.

A metodologia aplicada à síntese de nanopartículas de prata e cobre, utilizando o método de redução química com glicose, se apresentou eficiente, observando-se a mudança rápida da coloração das soluções onde se adicionou  $\text{AgNO}_3$  e  $\text{CuSO}_4$  de incolor para acinzentado ou para amarelo claro, respectivamente (Figura 3.2).



**Figura 3.2:** (A) Nanopartículas de prata sintetizadas com glicose; (B) Nanopartículas de prata sintetizadas com extrato de *B. subtilis* MV 126P ; (C) Nanopartículas de cobre sintetizadas com glicose.

Foi observado que a concentração máxima de  $\text{AgNO}_3$  a ser aplicada para a síntese das AgNps é de 2,5 mmol/L, equivalente a uma concentração final de Ag de 270 mg/L. Acima dessa concentração, observou-se a ausência da coloração característica e pico de absorvância, além da formação de um precipitado escuro (figura 3.3 A e C). Para as CuNps, o valor máximo de absorvância a 475 nm foi obtido quando a concentração de  $\text{CuSO}_4$  utilizada na síntese foi de 0,38 mmol/L (figura 3.3 B).

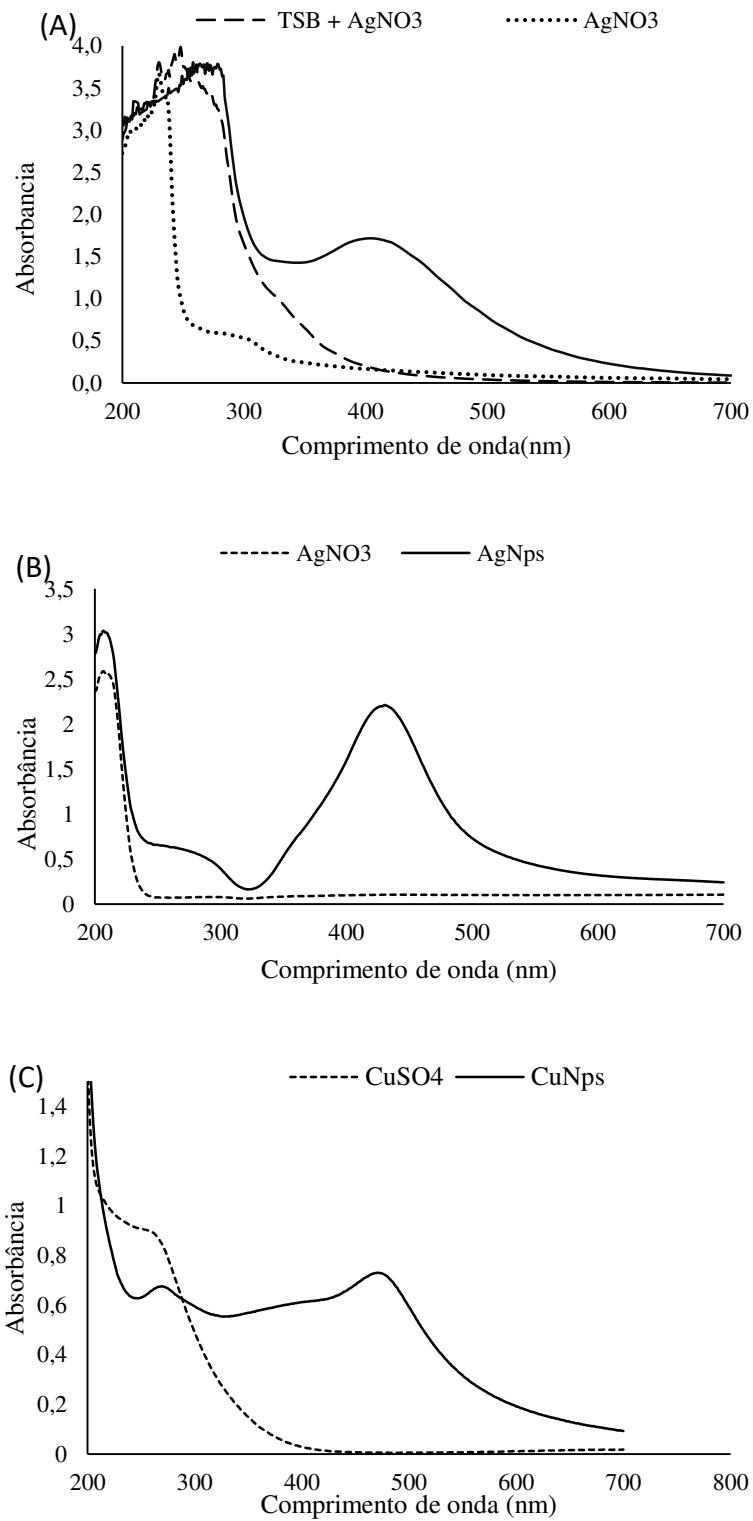


**Figura 3.3:** Efeito da concentração de AgNO<sub>3</sub> e CuSO<sub>4</sub> sobre a produção de AgNps e CuNPs. (A) valores de máxima absorvância a 419 nm das soluções coloidais de prata produzidas com AgNO<sub>3</sub> nas concentrações de 0,77; 0,96; 1,27; 1,92; 2,54 e 3,85 mmol/L. (B) Valores de máxima absorvância a 475 nm das soluções coloidais de cobre produzidas com CuSO<sub>4</sub> nas concentrações de 0,38; 0,43; 0,48; 0,55; 0,63 e 0,77 mmol/L. (C) Detalhe das soluções coloidais de prata produzidas com diferentes concentrações de AgNO<sub>3</sub>. Nota-se a formação de precipitados no tratamento em que se utilizou concentração de AgNO<sub>3</sub> de 3,85 mmol/L.

A análise do espectro UV-VIS das soluções de nanopartículas de prata produzidas com o sobrenadante de *B. subtilis* MV126P demonstrou a presença de picos de absorvância a 408 nm (Figura 3.4 A). Não foram detectados picos de absorção nas soluções onde se tentou sintetizar as CuNPs usando-se esse mesmo agente redutor. Nas soluções contendo AgNPs e CuNPs sintetizadas a partir da glicose como agente redutor, foram detectados picos de absorvância nas posições de 419 nm e 475 nm, respectivamente (Figura 3.4 C e D), o que evidencia a presença das nanopartículas nas amostras. Para as nanopartículas de prata e cobre, o espectro eletrônico da solução recém-preparada deve apresentar picos de absorvância próximos a 420 nm e 480 nm, respectivamente, referente à banda de ressonância dos plásmons de superfície de nanopartículas esféricas,

confirmando os resultados obtidos. Esse pico não foi observado nos controles negativos e nem nas soluções dos reagentes utilizados na síntese (Figura 3.4).

Segundo LIZ-MARZÁN (2004), alterações no tamanho e nas formas das nanopartículas podem provocar modificações nas propriedades físicas e na reatividade de compostos químicos, inclusive nas próprias nanopartículas. No caso das propriedades ópticas, a mudança e diversidade de cores observada quando uma nanopartícula é sintetizada está relacionada às oscilações dos elétrons de condução em ressonância com a luz incidente, denominada ressonância dos plásmons de superfície (DANG et al., 2011). Esse efeito torna possível, então, detectar a presença de nanopartículas metálicas utilizando-se a varredura do espectro UV-visível (DANG et al., 2011). Tal fenômeno permite que as nanopartículas desses elementos sejam assim caracterizadas por um pico de absorbância em um comprimento de onda específico (DANG et al., 2011).



**Figura 3.4:** Espectros de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-VIS) das soluções contendo nanopartículas de prata sintetizadas com extrato livre de células de *B. subtilis* MV 126P (A); AgNps sintetizadas com glicose (B) e CuNps sintetizadas com glicose (C).

Sobrenadantes e extratos derivados de organismos vivos, tais como bactérias (NARAYANAN & SAKTHIVEL, 2010) e plantas (SHENDE et al., 2015), geralmente utilizados como agentes redutores no processo de síntese de nanopartículas, apresentam composição química complexa, possuindo uma grande variedade de biomoléculas como enzimas, proteínas, aminoácidos, carboidratos e vitaminas que podem ser responsáveis por realizar o processo de biorredução de íons metálicos, dando origem a nanopartículas (DEEPAK & KALISHWARALAL, 2011).

Estudos têm demonstrado que muitos microrganismos, como *Acinetobacter calcoaceticus* (SINGH et al., 2013), *Streptomyces sp.* (KARTHIK et al., 2014), *Brevibacterium casei* (KALISHWARALAL et al., 2010) e *Bacillus licheniformis* (SHANTHI et al., 2016; SRIRAM et al., 2012) podem produzir nanopartículas inorgânicas através de rotas intracelulares ou extracelulares. A biossíntese de nanopartículas metálicas por microrganismos ocorre pelo contato do íon metálico principalmente com enzimas redutoras, que podem estar presentes na parede celular ou extracelularmente e cofatores, como o NADH (NARAYANAN & SAKTHIVEL, 2010). As enzimas envolvidas nesse processo são geralmente do tipo NADH-dependentes, como as nitrato-redutases (DURÁN et al., 2011). Procariotos do gênero *Bacillus e Klebsiella* possuem um tipo de nitrato-redutase NADH-dependente presente no citoplasma, a qual participa da via anabólica de assimilação do nitrogênio (GONZALEZ et al., 2006).

Estudo conduzido com nitrato-redutase purificada do fungo *Fusarium oxysporum*, comprovou sua efetividade como agente redutor durante a síntese de nanopartículas de prata *in vitro* (ANIL KUMAR et al., 2007). No estudo de VELMURUGAN et al. (2014), observou-se a presença de quantidades significativas da enzima nitrato-redutase no sobrenadante da cultura de *B. subtilis* cultivado em caldo nutriente. Os autores sugeriram que essa enzima participa da redução de íons metálicos no meio extracelular, resultando na formação de nanopartículas metálicas. Nesse processo, a enzima é ativada pela presença de nitrato e recebe elétrons do NADH (gerado durante o processo de glicólise), transferindo-os posteriormente para os íons presentes no meio, como  $Ag^+$ , possibilitando a sua biorredução e subsequente formação das nanopartículas (SINGH et al., 2015).

Carboidratos como a glicose também são reconhecidos como agentes redutores de íons metálicos, como prata (MOCANU et al., 2013) e cobre (PANIGRAHI et al., 2006). O processo de produção de nanopartículas utilizando a glicose como agente redutor

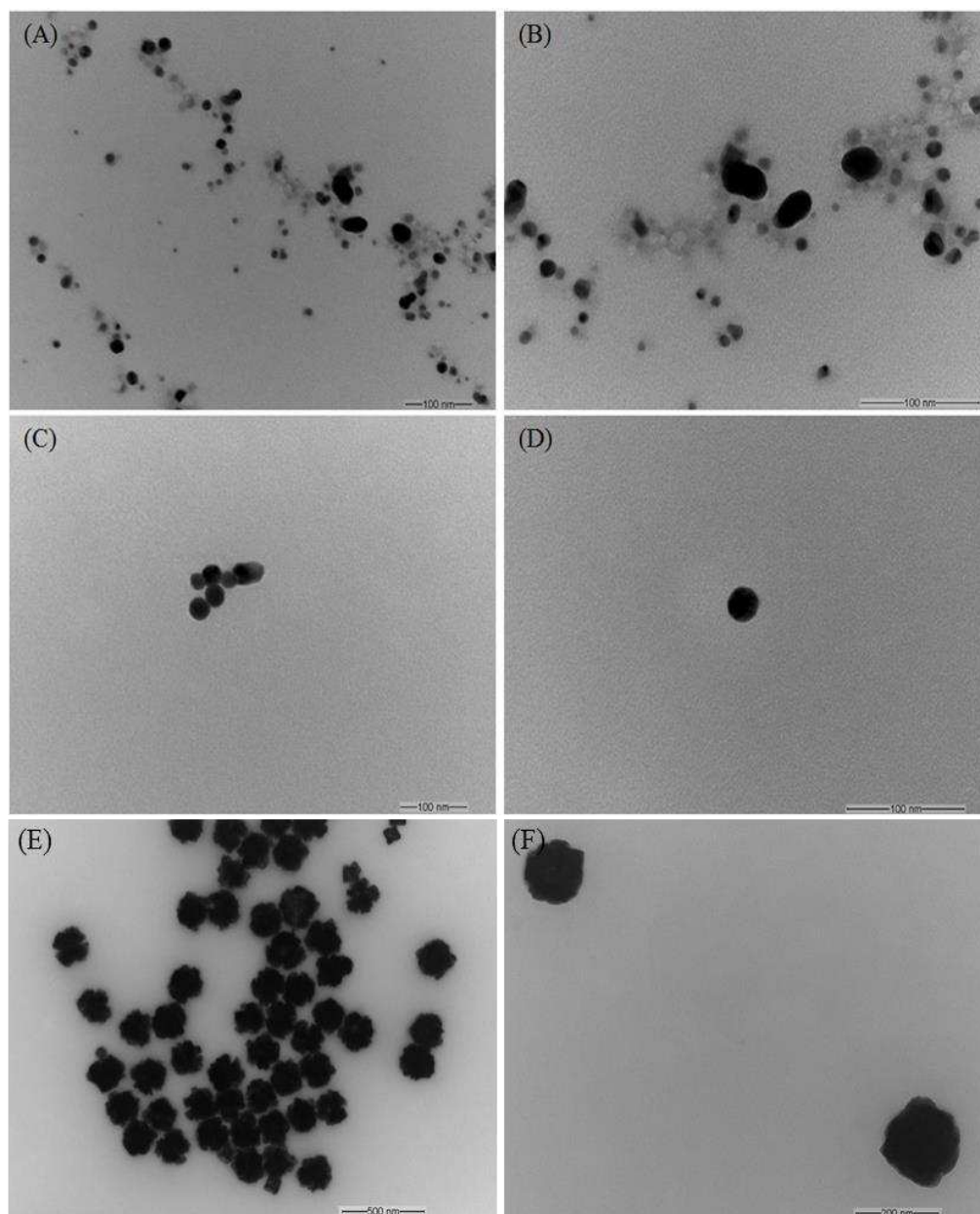
envolve uma série de reações (PANIGRAHI et al., 2006). Quando uma solução de glicose é aquecida a cerca de 60 °C em meio básico, a molécula se abre, expondo grupos carboxílicos que doam elétrons para o íon metálico em solução, proporcionando sua redução e consequente nucleação, o que leva à formação das nanopartículas (PANIGRAHI et al., 2006).

Peptídeos também têm ganhado destaque na síntese e estabilização de nanopartículas de prata. Essas biomoléculas estão geralmente presentes no sobrenadante de culturas microbianas e contêm aminoácidos como arginina, cisteína, triptofano e ácido glutâmico, que também podem estar envolvidos no processo de síntese (NAM et al., 2008). O triptofano, por exemplo, em pH elevado, é convertido em um radical triptofil, que doa elétrons para os íons  $\text{Ag}^+$ , o que resulta na produção de nanopartículas de prata de tamanho relativamente pequeno (SI & MANDAL, 2007).

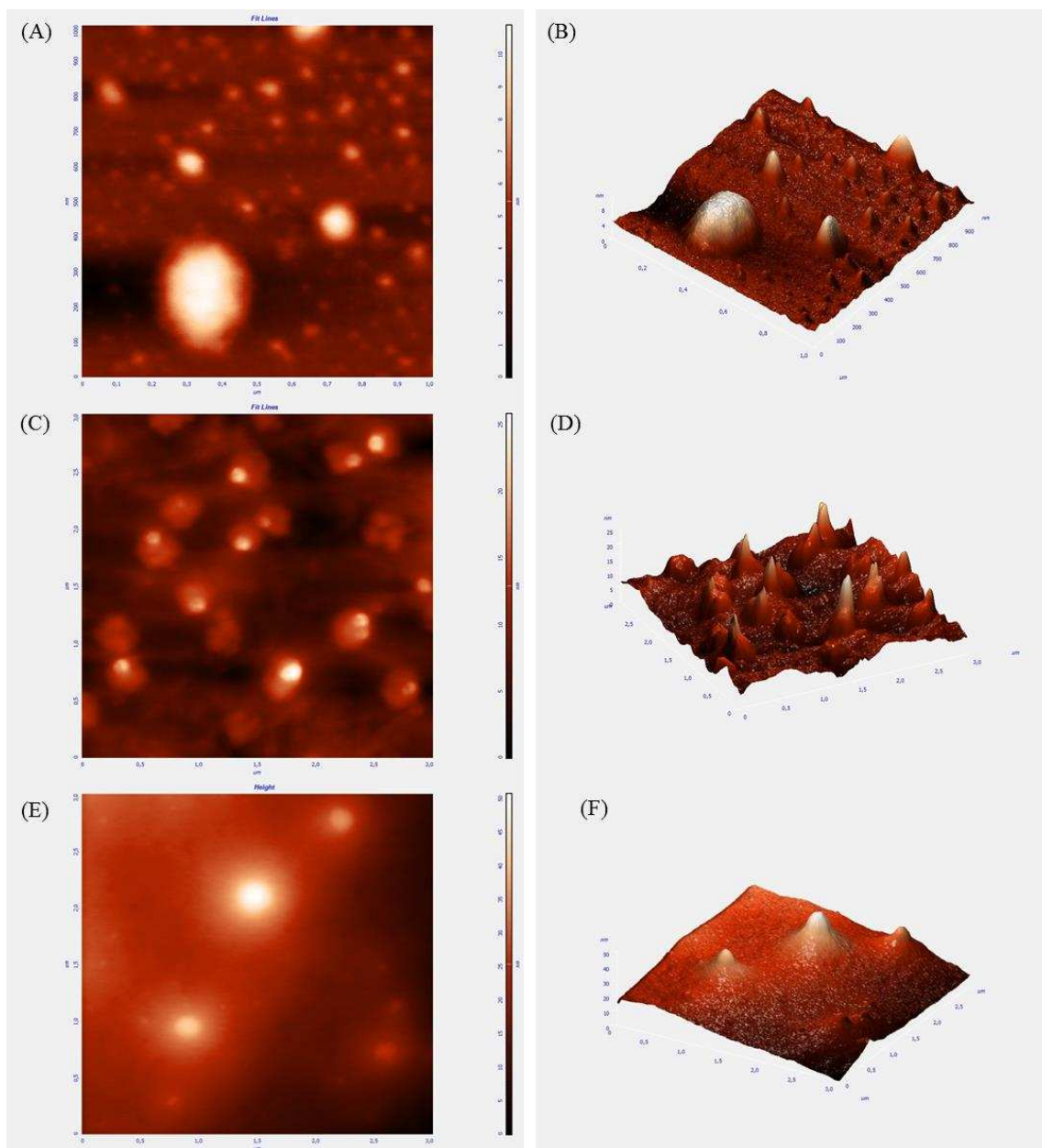
#### **3.4.2. Análise da morfologia e da dimensão das nanopartículas**

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão - TEM - confirmaram a produção de partículas em nanoescala, predominantemente esféricas (Figura 3.5). As nanopartículas de prata produzidas com sobrenadante da cultura de *B. subtilis* MV 126P apresentaram variação de formas e dimensão, podendo-se observar a presença de partículas esféricas e elípticas (Figura 3.5 A e B). As micrografias das nanopartículas produzidas com glicose como agente redutor revelaram a presença de nanopartículas esféricas de prata (Figura 3.5 C e D) e de cobre (Figura 3.5 E e F) de dimensão mais homogênea.

A análise das imagens obtidas por microscopia de força atômica - AFM - também confirmou a presença das nanopartículas sintetizadas com os dois agentes redutores (Figura 3.6 A a F).



**Figura 3.5:** Micrografias eletrônicas de transmissão de nanopartículas de prata sintetizadas usando extrato livre de células de *B. subtilis* MV 126P (A e B) ou glicose (C e D) como agentes redutores. (E e F): nanopartículas de cobre produzidas a partir do uso da glicose como agente redutor.



**Figura 3.6:** Imagens de microscopia de força atômica de nanopartículas de prata sintetizadas usando extrato livre de células de *B. subtilis* MV 126P (A e B) ou glicose (C e D) como agentes redutores. (E e F): nanopartículas de cobre produzidas a partir do uso de glicose como agente redutor.

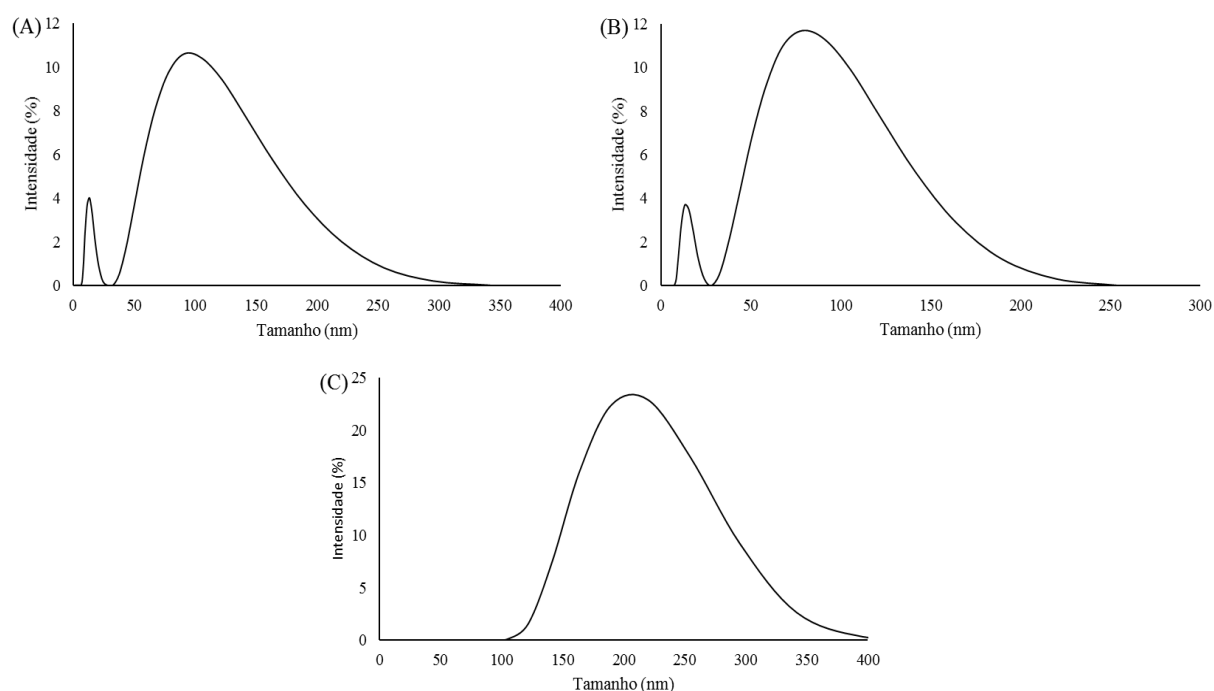
A tabela 3.1 apresenta as análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS) das nanopartículas obtidas com os diferentes agentes redutores. Elas revelaram a presença de dois grupos de intensidade de tamanho distintos para as amostras contendo nanopartículas de prata obtidas com os dois agentes redutores, demonstrando uma variabilidade no tamanho das mesmas (Figura 3.7 A e B). Apesar de também se observar alguma

dispersão, uma maior uniformidade de dimensão foi observada para as nanopartículas de cobre sintetizadas com glicose (Figura 3.7 C).

**Tabela 3.1:** Valores médios de distribuição e intensidade (%) de tamanho (nm) das nanopartículas de prata sintetizadas usando extrato livre de células de *B. subtilis* MV 126P (AgNps *B. subtilis*) e glicose (AgNps glicose) e nanopartículas de cobre produzidas com glicose (CuNps glicose)

Nanopartículas	Grupo 1		Grupo 2	
	Tamanho(nm)*	Intensidade(%)*	Tamanho(nm)*	Intensidade(%)*
AgNps <i>B. subtilis</i>	13,54 ± 1,7	4 ± 0,5	91,28 ± 9,1	10,6 ± 0,3
AgNps glicose	11,7 ± 0,8	3,7 ± 0,7	78,82 ± 6,8	10,2 ± 0,9
CuNps glicose	220,2 ± 15,05	22,9 ± 2,3	-	-

\*valores médios de três repetições.

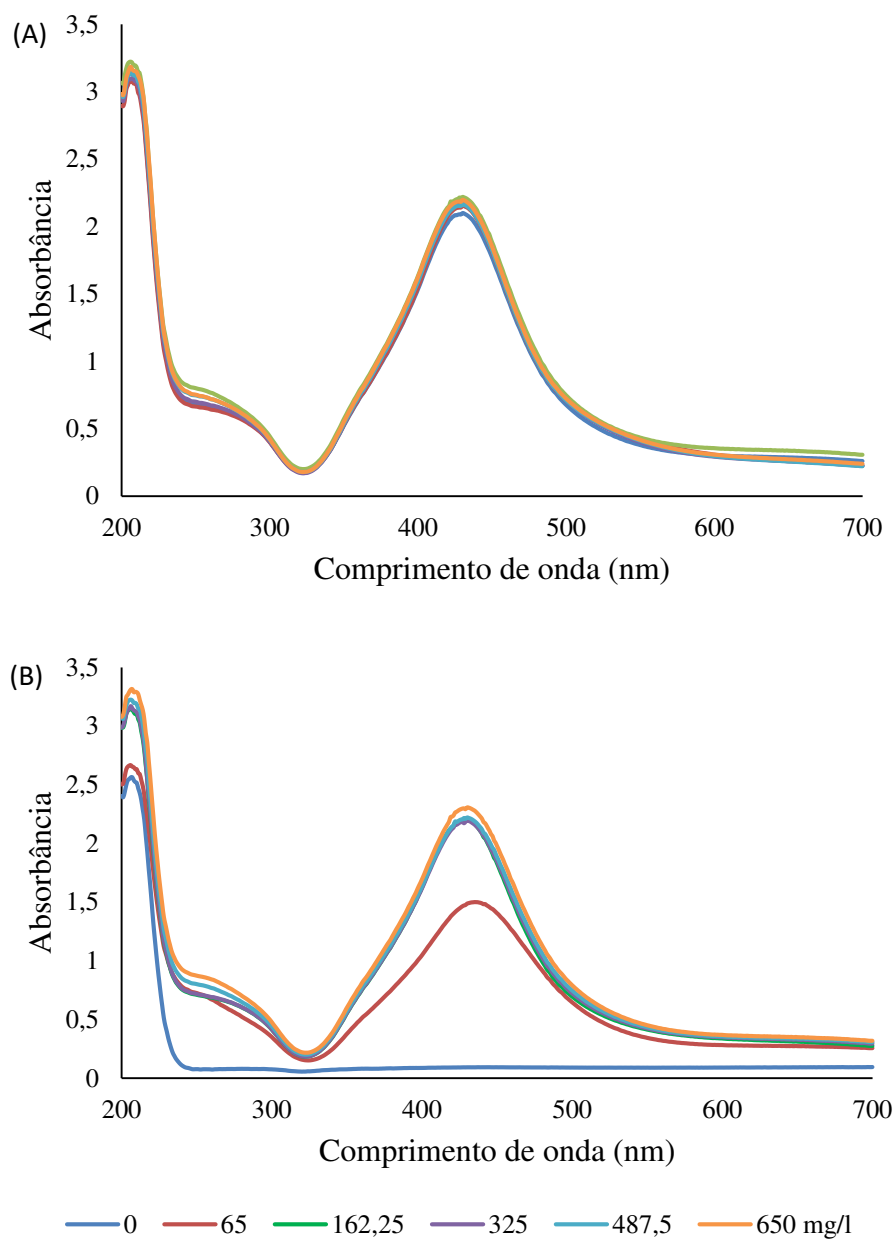


**Figura 3.7:** Distribuição de tamanho das nanopartículas determinada pelo espalhamento dinâmico de luz. Nanopartículas de prata produzidas com extrato livre de células de *B. subtilis* isolado MV 126P (A) ou glicose (B) como agentes redutores e nanopartículas de cobre produzidas com glicose (C) como agente redutor.

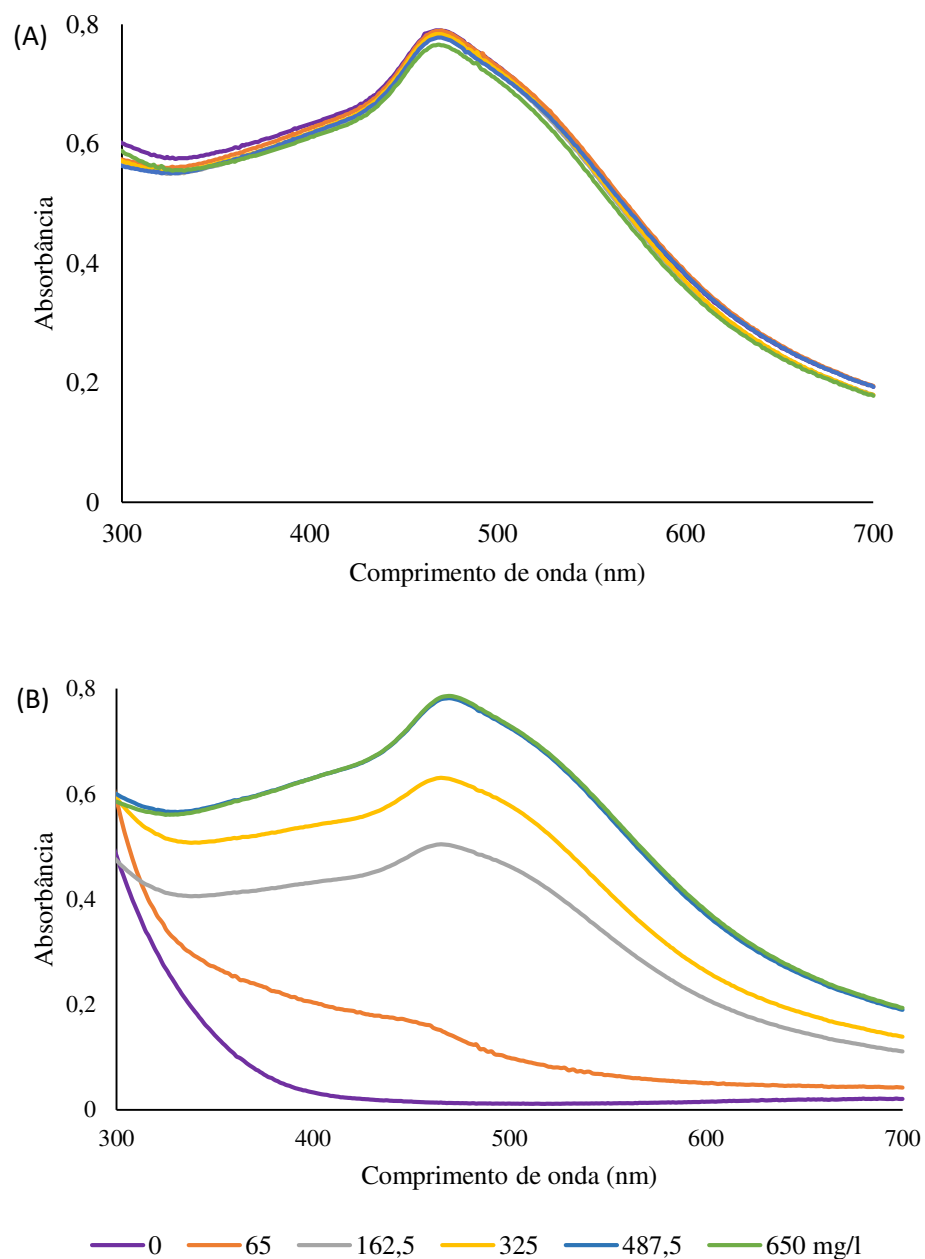
O tamanho e a forma das nanopartículas são dependentes de algumas variáveis que podem estar presentes no meio onde ocorre sua síntese e nucleação. Essas variáveis incluem o pH, a temperatura e o tempo de reação. No estudo realizado por VELMURUGAN et al. (2014), no qual foram avaliadas as condições mais adequadas para a biossíntese de nanopartículas de prata com sobrenadante de uma cultura de *B. subtilis*, demonstrou-se que pH igual a 10, temperatura de 60 °C e período de incubação de 12 horas favorecem a produção de nanopartículas esféricas, com algumas irregularidades, de tamanho aproximado de 20 nm. Geralmente, em meio com pH ácido e baixa temperatura, são formados poucos pontos de nucleação onde possa ocorrer a deposição dos átomos metálicos, obtendo-se assim um número reduzido de nanopartículas com maior tamanho. Já em valores de pH mais alcalinos, a presença de alta concentração de íons OH<sup>-</sup> favorece um maior número de pontos de nucleação, resultando na predominância de partículas de menor dimensão (DEEPAK & KALISHWARALAL, 2011).

### **3.4.3. Estabilidade das nanopartículas de prata e cobre**

A análise do espectro de absorção no UV-VIS das nanopartículas estabilizadas por ramnolípídeo imediatamente após a síntese e após 150 dias de armazenamento demonstrou a manutenção da estabilidade das nanopartículas. A dose mínima de ramnolípídeo necessária para manutenção integral da estabilidade das nanopartículas de prata sintetizadas com glicose foi de 162,5 mg/L (Figura 3.8 A e B) e, para nanopartículas de cobre, foi de 487,5 mg/L (Figura 3.9 A e B). As soluções coloidais tratadas com doses de ramnolípídeo iguais ou superiores a essas doses mantiveram a estabilidade durante todo o período de avaliação (150 dias após terem sido sintetizadas), sem decréscimos significativos nos valores de absorbância. Nesse período, não ocorreu mudança na coloração ou formação de precipitado visível nas soluções.



**Figura 3.8:** Espectros de absorção na região do ultravioleta visível (UV-VIS) das nanopartículas de prata (AgNps) sintetizadas com glicose estabilizadas com diferentes concentrações de ramnolípídeo. AgNps recém-sintetizadas e estabilizadas (A); AgNps estabilizadas com diferentes concentrações de ramnolípídeo, após 150 dias de armazenamento a 4 °C (B).



**Figura 3.9:** Espectros de absorção na região do ultravioleta visível (UV-VIS) das nanopartículas de cobre (CuNps) sintetizadas com glicose estabilizadas com diferentes doses de ramnolipídeo. CuNps recém-sintetizadas e estabilizadas (A). CuNps estabilizadas com diferentes doses de ramnolipídeo, após 150 dias de armazenamento a 4 °C (B).

Amostras de nanopartículas de prata sintetizadas com glicose como agente redutor contendo a dose mínima de ramnolipídeo necessária para manutenção da estabilidade foram liofilizadas, imediatamente ressuspendidas e armazenadas por 150 dias. Essas

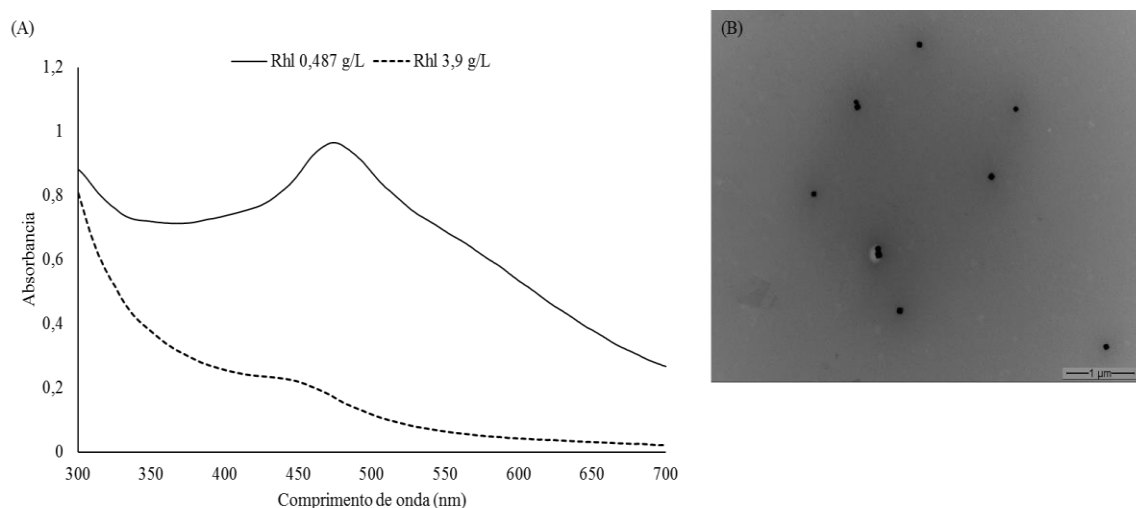
amostras não apresentaram perda significativa de estabilidade nem de dispersão de tamanho (dados não-apresentados).

Um grande número de compostos naturais e sintéticos tem sido utilizado para a manutenção da estabilidade de nanopartículas metálicas, evitando a oxidação, a agregação e a precipitação, que resultam na perda de suas propriedades (MESHRAM et al., 2013). Surfactantes sintéticos são conhecidos por sua ação estabilizante de nanopartículas (REDDY et al., 2009). Uma classe de surfactantes que tem recebido grande atenção nas últimas décadas são os biossurfactantes, que são surfactantes naturais provenientes do metabolismo microbiano (KIRAN, et al., 2014). Neste trabalho foi utilizado, com sucesso, um biossurfactante (ramnolipídeo) como agente estabilizante de nanopartículas.

A glicose também pode contribuir, durante a síntese de nanopartículas, tanto como agente redutor quanto como agente estabilizante (JANARDHANAN et al., 2009). Em meio alcalino, a molécula de glicose se abre formando o ácido glucônico, expondo seus grupos aldol (-CHO), que são imediatamente oxidados a grupos carboxil (-COOH). Esses conferem estabilidade às nanopartículas (PANIGRAHI et al., 2006). O mecanismo de proteção envolve a aderência da molécula de ácido glucônico à superfície da nanopartícula, proporcionando-lhe estabilidade eletrostática e impedindo a perda de elétrons das nanopartículas (JANARDHANAN et al., 2009). No entanto, somente a estabilidade eletrostática não é suficiente para conservação das nanopartículas, principalmente de partículas de maior dimensão, como as de cobre (Tabela 3.1). É necessária também a ação estérica de estabilidade, conferida em nosso trabalho pelo ramnolipídeo, para evitar a oxidação e a agregação das nanopartículas.

É provável que o papel do biossurfactante no processo de estabilização esteja associado à deposição das moléculas sobre a superfície das nanopartículas, impedindo a perda de elétrons, a sua agregação e consequente precipitação. SINGH et al. (2014) já haviam demonstrado esse fenômeno, constatando que doses de ramnolipídeo acima da sua concentração micelar crítica (CMC) proporcionaram deposição do biossurfactante no entorno de nanopartículas de zinco, resultando em uma repulsão estérica que possibilitou a manutenção de sua estabilidade.

Um fenômeno observado no presente trabalho, e que ajuda a reforçar a hipótese de que a estabilidade estérica proporcionada pelo ramnolipídeo se dá por meio da formação de micelas, foi a perda completa do pico de absorbância característico das nanopartículas de cobre, quando se utilizou 3,9 g/L de ramnolipídeo (equivalente a cerca de 60 vezes a concentração micelar crítica) (Figura 3.10 A). Aparentemente, em concentrações muito elevadas de ramnolipídeos, ocorre a formação de estruturas complexas ao redor das nanopartículas individuais, impedindo a penetração de luz no comprimento de onda correspondente ao pico de absorção das nanopartículas e sua consequente absorção pelas mesmas. A mesma amostra foi submetida à microscopia de transmissão. As imagens revelaram manchas ao redor das nanopartículas, evidenciando a interação das mesmas com o ramnolipídeo (Figura 3.10 B).



**Figura 3.10:** (A) Espectro de absorção na região do ultravioleta visível (UV-VIS) das nanopartículas de cobre (CuNps) sintetizadas com glicose e estabilizadas com diferentes doses de ramnolipídeo (Rhl). (B) Micrografia eletrônica de transmissão das CuNps estabilizadas com Rhl a 3,9 g/L, evidenciando a presença de halos formados pelo Rhl ao redor das partículas.

As amostras contendo nanopartículas de prata sintetizadas com extrato de *B. subtilis* MV126P mantiveram-se estáveis, independentemente da concentração de ramnolipídeo aplicada, provavelmente pela presença de outros agentes estabilizadores no extrato da cultura desse isolado.

SAIFUDDIN et al. (2009) já haviam reportado que soluções coloidais de íons prata produzidas com sobrenadante de cultura de *B. subtilis* permanecem estáveis por

longos períodos. Os autores atribuíram essa elevada estabilidade à presença de agentes estabilizadores, como proteínas, secretados pelas células bacterianas para o meio extracelular. Ainda de acordo com esses autores, aminoácidos como fenilalanina, triptofano e tirosina, presentes no sobrenadante de *B. subtilis*, podem estar envolvidos na manutenção da estabilidade das nanopartículas de prata. Esse efeito pôde também ser evidenciado no presente trabalho, uma vez que as nanopartículas de prata sintetizadas extracelularmente por *B. subtilis* MV 126P apresentaram pico de absorvância característico sem alterações durante todo o período de avaliação (armazenamento a 4°C durante 150 dias).

### **3.5. CONCLUSÕES.**

Neste trabalho, foram produzidas soluções coloidais de prata e cobre utilizando-se glicose ou sobrenadante de cultura de *B. subtilis* isolado MV 126P como agentes redutores. Não foram obtidas nanopartículas de cobre quando se utilizou o sobrenadante da cultura. O método utilizado demonstrou ser rápido e eficiente, tendo proporcionado alta estabilidade das nanopartículas de prata produzidas quando o agente redutor foi o sobrenadante da cultura de *B. subtilis* MV126P. A adição do biossurfactante ramnolipídeo às soluções de nanopartículas de prata e de cobre obtidas utilizando-se glicose como agente redutor conferiu estabilidade às mesmas, sendo, portanto, considerado indicado para conservação de suas propriedades. Os métodos de produção utilizados se mostraram vantajosos dada a sua rapidez, praticidade e ausência de toxicidade, além de poderem ser adaptados para produção em larga escala em trabalhos futuros.

### 3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ANIL KUMAR, S., ABYANEH, M.K., GOSAVI, S.W., KULKARNI, S.K., PASRICHA, R., AHMAD, A., KHAN, M.I. Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO<sub>3</sub>. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 439–45. 2007
- ASANITHI, P., CHAIYAKUN, S., LIMSUWAN, P. Growth of silver nanoparticles by DC magnetron sputtering. **Journal of Nanomaterials**, v. 79, p.1–8, 2012.
- CHEIRMADURAI, K., BISWAS, S., MURALI, R., THANIKAIVELAN, P. Green synthesis of copper nanoparticles and conducting nanobiocomposites using plant and animal sources. **RSC Advanceds**, v. 4, p.19507–19511, 2014.
- CUEVAS, N.; DURÁN, M.; DIEZ, C.; TORTELLA, G. R.; RUBILAR, O. Extracellular biosynthesis of copper and copper oxide nanoparticles by *Stereum hirsutum*, a native white-rot fungus from chilean forests. **Journal of Nanomaterials**, p. 1–7, 2015.
- DANG, T.M.D., LE, T.T.T., FRIBOURG-BLANC, E., DANG, M.C. Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *Adv. Nat. Sci. Nanosci.* **Nanotechnology**. v.2, 2011.
- DEEPAK, V., KALISHWARALAL, K., Metal Nanoparticles in Microbiology. **Methods in Nanoparticles Microbiology**, p. 17–36, 2011.
- DURÁN, N., MARCATO, P.D., DURÁN, M., YADAV, A., GADE, A., RAI, M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. **Appl. Microbiol. Biotechnology**, v.90 n. 5, p. 1609-1624, 2011.
- ELBESHEHY, E.K.F., ELAZZAZY, A.M., AGGELIS, G. Silver nanoparticles synthesis mediated by new isolates of *Bacillus* spp ., nanoparticle characterization and their activity against Bean Yellow Mosaic Virus and human pathogens. v. 6, p. 1–13, 2015.
- FARIAS, C.B.B., SILVA, A.F., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SOUZA, J.E.G., SARUBBO, L.A. Synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant produced in low-cost medium as stabilizing agent. **Electronic Journal. Biotechnology**, v. 17, n. 3, p.122–125, 2014

- GONZÁLEZ, P.J., CORREIA, C., MOURA, I., BRONDINO, C.D., MOURA, J.J.G.  
Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction.  
**Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 5, p. 1015-1023, 2006.
- GURUNATHAN, S., KALISHWARALAL, K., VAIDYANATHAN, R., DEEPAK, V.,  
RAM KUMAR PANDIAN, S., MUNIYANDI, J., HARIHARAN, N., HYUN EOM,  
S. Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using  
*Escherichia coli*. **Colloids Surfaces Biointerfaces**, v.74, n.1, p. 328–335, 2009.
- JANARDHANAN, R., KARUPPAIAH, M., HEBALKAR, N., RAO, T.N., 2009.  
Synthesis and surface chemistry of nano silver particles. **Polyhedron**, v. 28, n.12, p.  
2522–2530, 2009.
- KALISHWARALAL, K., DEEPAK, V., RAM KUMAR PANDIAN, S.,  
KOTTAISAMY, M., BARATHMANIKANTH, S., KARTIKEYAN, B.,  
GURUNATHAN, S. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using  
*Brevibacterium casei*. **Colloids Surfaces Biointerfaces**, v. 77, n.2, p. 257–262,  
2010.
- KARTHIK, L., KUMAR, G., KIRTHI, A.V., RAHUMAN, A.A., BHASKARA RAO, K.  
V. *Streptomyces* sp. LK3 mediated synthesis of silver nanoparticles and its  
biomedical application. **Bioprocess Biosystems and Engering**, v. 37, n.2, p. 261–  
267, 2014.
- KIRAN, G.S., SELVIN, J., MANILAL, A., SUJITH, S. Biosurfactants are green  
stabilizers for the biological synthesis of nanoparticles. **Criticals Reviews in  
Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 354-364, 2011.
- LIZ-MARZÁN, L.M. Nanometals: Formation and color. *Materials. Today*, v. 7, n. 2,  
p.26–31, 2004.
- MESHARAM, S.M., BONDE, S.R., GUPTA, I.R., GADE, A.K., RAI, M.K.. Green  
synthesis of silver nanoparticles using white sugar. **IET Nanobiotechnology**, n.7,  
v. 1, p. 28–32, 2013.
- MOCANU, A., PASCA, R.D., TOMOAI, G., GARBO, C., FRANGOPOL, P.T.,  
HOROVI, O., TOMOAI-COTISEL, M. New procedure to synthesize silver  
nanoparticles and their interaction with local anesthetics. **International. Journal of  
Nanomedicine**, v.8, p. 3867–3874, 2013.
- NAM, K.T., LEE, Y.J., KRAULAND, E.M., KOTTMANN, S.T., BELCHER, A.M.

Peptide-mediated reduction of silver ions on engineered biological scaffolds. **ACS Nano**, v. 2, n.7, p.1480–1486, 2008.

NARAYANAN, K.B., SAKTHIVEL, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Advanced. Colloid Interface Science**, v.156, n.1, p. 1-13, 2010.

PANIGRAHI, S., KUNDU, S., GHOSH, S.K., NATH, S., PRAHARAJ, S., BASU, S., PAL, T. Selective one-pot synthesis of copper nanorods under surfactantless condition. **Polyhedron**, v. 25, n. 5, p. 1263–1269, 2006.

REDDY, A.S., CHEN, C.Y., BAKER, S.C., CHEN, C.C., JEAN, J.S., FAN, C.W., CHEN, H.R., WANG, J.C. Synthesis of silver nanoparticles using surfactin: A biosurfactant as stabilizing agent. **Materials. Letters**, v. 63, n. 15, p. 1227–1230, 2009.

ROLDÁN, M.V., PELLEGRINI, N., DE SANCTIS, O. Electrochemical Method for Ag-PEG Nanoparticles Synthesis. **Journal Nanoparticles**, v. 2013, p.1–7, 2013.

SAIFUDDIN, N., WONG, C.W., YASUMIRA, A.A.N. Rapid Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatant of Bacteria with Microwave Irradiation. **E-Journal of Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 61–70, 2009.

SHANTHI, S., DAVID, B., VELUSAMY, P., VIJAYAKUMAR, S., TA, C., VASEEHARAN, B. Microbial Pathogenesis Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dabhl and their antibiotic activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. **Microbial Pathology**, v. 93, p. 70–77, 2016.

SHENDE, S.; Ingle, A. P.; GADE, A.; RAI, M. • Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus medica* Linn. (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 865–873, 2015.

SI, S., MANDAL, T.K. Tryptophan-based peptides to synthesize gold and silver nanoparticles: A mechanistic and kinetic study. **Chemistry European Journal**, v. 13, n.11, p. 3160-3168, 2007.

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agriculture**, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.

SINGH, R., WAGH, P., WADHWANI, S., GAIDHANI, S., KUMBHAR, A., BELLARE, J., CHOPADEV, B. Synthesis, optimization, and characterization of

- silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. **International Journal Nanomedicine**, v. 8, p. 4277–4289, 2013.
- SINGH B. N.; RAWAT A.K.S.; KHAN, W.; NAQVI, A.H.; SINGH, B.R. Biosynthesis of Stable Antioxidant ZnO Nanoparticles by *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.
- SINGH, R., SHEDBALKAR, U.U., WADHWANI, S.A., CHOPADE, B.A. Bacteriogenic silver nanoparticles : synthesis , mechanism , and applications. **Applied Microbiol. Biotechnology**, v. 99, n.11, p. 4579-4593, 2015.
- SOLOMON, S.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAN, A.; RUTKOWSKY, S.; BORITZ, C. Synthesis and study of silver nanoparticles. *EUA: Journal of Chemical Education*, v. 84, n. 2, p. 322, 2007.
- SOTIRIOU, G.A., PRATSINIS, S.E. Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. **Environment Science Technology**, v. 44, n.14, p. 5649–5654, 2010.
- SOTIRIOU, G.A., TELEKI, A., CAMENZIND, A., KRUMEICH, F., MEYER, A., PANKE, S., PRATSINIS, S.E. Nanosilver on nanostructured silica: Antibacterial activity and Ag surface area. **Chemistry Engineering Journal**, v.170, n.2, p. 547–554, 2011.
- SRIRAM, M.I., KALISHWARALAL, K., GURUNATHAN, S. Biosynthesis of Silver and Gold Nanoparticles Using *Bacillus licheniformis*. **Nanoparticles in Biology and Medicine**, v 906, p. 33–43, 2012.
- TIEN, D.C., TSENG, K.H., LIAO, C.Y., HUANG, J.C., TSUNG, T.T. Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method. **Journal Alloys Compedium**, v. 463, n. 1, p. 408–411, 2008.
- VELMURUGAN, P., IYDROOSE, M., MOHIDEEN, M.H.A.K., MOHAN, T.S., CHO, M., OH, B.T. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus subtilis* EWP-46 cell-free extract and evaluation of its antibacterial activity. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 37, n. 8, p. 1527-1534, 2014.
- WEI, L., LU, J., XU, H., PATEL, A., CHEN, Z., CHEN, G. Silver nanoparticles : synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**. v.20, n. 5, p. 595–601, 2015.

## CAPITULO 4

### **AVALIAÇÃO DE EXTRATOS MICROBIANOS E SUSPENSÕES COLOIDAIIS NO CONTROLE DE *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phakopsora pachyrhizi***

#### **4.1. RESUMO**

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de biossurfactantes e nanopartículas para o controle de doenças em plantas provocadas por três importantes fungos fitopatogênicos: *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phakopsora pachyrhizi*. Para cada composto avaliado, inicialmente foi determinada uma concentração mínima inibitória (CMI). Discos de micélio de *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* foram inoculados em placas de Petri contendo meio BDA tratados com as seguintes soluções sob diferentes concentrações de seu princípio ativo: extrato bruto de *B. subtilis* LBBMA AP01 (BsAP01) contendo os biossurfactantes surfactina, fengicina e iturina; Ramnolipídeo (Rhl); nanopartículas de prata (AgNps) produzidas com sobrenadante de *B. subtilis* MV 126 P (AgNps – MV 126P) ou glicose (AgNps – Glu) como agentes redutores; AgNps produzidas com glicose como agente redutor e ramnolipídeo como agente estabilizante (AgNps – Glu + Rhl). Como controles, foram utilizados água destilada (Ad); sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>); nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>); fungicida Locker® (carbedazin, tebuconazole e cresoxin-metílico) (Lk). Neste ensaio foram avaliados o diâmetro das colônias e a inibição do crescimento micelial (ICM %). A partir da determinação da CMI, avaliou-se o efeito dos compostos acima sobre a germinação de esporos de *Botrytis cinerea* e *Phakopsora pachyrhizi* e escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* e consequente formação de colônias. Para o teste *in vivo*, pétalas de rosas (*Rosa hybrida*) e folhas de repolho (*Brassica oleracea* grupo Capitata) foram incubadas em câmaras tipo “Gerbox” e tratadas com as mesmas soluções citadas acima, exceto as que continham cobre na sua composição (nanopartículas de cobre e o sal CuSO<sub>4</sub>). A germinação de esporos ou escleródios das três espécies de fungos e o crescimento micelial de *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* foram significativamente menores em todos os tratamentos, comparativamente ao controle com água destilada. Os resultados de inibição dos fitopatógenos *in vivo* foram similares aos obtidos *in vitro*, com destaque para o efeito dos tratamentos BsAP01, Rhl e daqueles contendo AgNps sobre a inibição da infecção por *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*. Dentre os tratamentos com AgNPs, destacou-se o que

continha nanopartículas de prata combinadas com ramnolipídeo (AgNps – Glu + Rhl), principalmente contra *B. cinerea*. Conclui-se que os biossurfactantes derivados do isolado *B. subtilis* AP01, ramnolipídeo e as AgNPs são eficazes no controle dos fungos fitopatogênicos estudados, tendo potencial para formulação de novos produtos fitossanitários.

**Palavras chave:** Nanopartículas metálicas; biossurfactantes; controle biológico; atividade antifúngica.

## 4.2. INTRODUÇÃO

As doenças de plantas são causadas por uma grande diversidade de microrganismos e conhecidas há muito tempo, praticamente desde o início da agricultura (BERGAMIN FILHO e KITAGIMA, 2011). Dentre os agentes etiológicos se destacam os fungos fitopatogênicos, responsáveis pelo maior número de enfermidades que acometem as plantas cultivadas (AMORIM et al., 2011).

*Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phakopsora pachyrhizi* são importantes fungos fitopatogênicos e, sob condições ambientais apropriadas, podem causar severas perdas em um grande número de culturas agrônômicas (AMORIM et al., 2016), chegando até mesmo a inviabilizar o cultivo de algumas plantas em locais onde a incidência desses fungos é elevada.

*B. cinerea* e *S. sclerotiorum* são causadores das doenças conhecidas como Mofo Cinzento e Mofo Branco, respectivamente, em diversas culturas de importância econômica. Essas espécies têm como característica a produção de estruturas de resistência conhecidas como escleródios, que podem se manter viáveis por longos períodos no solo na ausência de condições favoráveis (e.g. ausência de hospedeiros), tornando difícil o manejo das doenças causadas por eles (PEREIRA et al., 2013; AMORIM et al., 2016). *P. pachyrhizi*, responsável pela doença conhecida como ferrugem asiática da soja, é um parasita obrigatório que produz uma grande quantidade de propágulos (urediniosporos), os quais podem ser transportados a grandes distâncias pelas correntes aéreas, tornando ineficazes algumas práticas culturais como a rotação de culturas ou o pousio (AMORIM et al., 2016).

O controle químico dessas três doenças é, em muitos casos, a única medida eficiente e economicamente viável de se garantirem altas produtividades e a qualidade dos produtos agrícolas. Variedades de plantas cultivadas, importantes pelo bom desempenho agrônômico e pela preferência dos consumidores, geralmente aliam essas características a uma certa vulnerabilidade a agentes fitopatogênicos. A ferrugem asiática da soja é um exemplo, onde a produtividade da soja está intimamente ligada ao seu manejo, pois severas perdas podem ocorrer se a ferrugem não for controlada. Já se tem relatos do aumento crescente do uso de fungicidas (SINDIVEG, 2016) e perda de efetividade de alguns compostos utilizados no manejo dessa doença, como triazóis e estrobirulinas (FRAC, 2017).

O incremento dos custos do controle químico, a perda de eficiência de alguns fungicidas em controlar doenças causadas por fungos, os riscos de contaminação dos operadores e dos produtos agrícolas e os problemas ambientais advindos do uso de produtos fitossanitários comerciais, indicam a necessidade da busca de alternativas para o controle de fitopatógenos, com destaque para a utilização de agentes de controle biológico e compostos alternativos por eles produzidos.

Dentre os compostos com potencial utilização no controle de fungos fitopatogênicos, destacam-se os biossurfactantes produzidos por espécies de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* spp. (glicolipídeos) e *Bacillus* spp. (lipopeptídeos). Dentre os glicolipídeos, os ramnolipídeos têm se destacado por sua eficiência em inibir o crescimento de alguns fitopatógenos, principalmente oomicetos (HULTBERG et al., 2010; BENGTON et al., 2015).

Efeitos fungitóxicos sobre fungos causadores de doenças em plantas têm sido também obtidos com lipopeptídeos. Dentre os membros desse grupo, a iturina, a fengicina e a surfactina são os mais bem caracterizados, além de terem comprovado o seu efeito antimicrobiano (ALVAREZ et al., 2011; GOND, et al., 2015; GUO et al., 2015).

Quanto ao modo de ação, tanto os ramnolipídeos quanto os lipopeptídeos podem atuar inibindo diretamente o micélio fúngico, a germinação de estruturas propagativas, como esporos e escleródios ou, quando aplicados na planta hospedeira, podem desencadear uma reação de resistência conhecida como indução de resistência sistêmica (ISR) (OGENA et al., 2007; TRAN et al., 2007; VARNIER et al., 2009; YAN et al., 2014).

Outro grupo de compostos conhecidos por possuir atividade antimicrobiana contra patógenos de plantas são as nanopartículas (KIM et al., 2012; OUDA, 2014; VELMURUGAN et al., 2014). Nanopartículas de prata e cobre, principalmente aquelas produzidas por tecnologias mais limpas, como as que fazem uso de substratos biocompatíveis, não-tóxicos e que apresentam simplicidade no processo de produção (SINGH et al., 2015), têm sido consideradas como possuindo elevado potencial para o controle de organismos fitopatogênicos. Alguns trabalhos demonstram os efeitos das nanopartículas de prata e cobre sobre o desenvolvimento de *B. cinerea* (MIN et al., 2009; OUDA, 2014) e *S. sclerotiorum* (KIM, et al., 2012), as quais promovem danos à parede celular e significativa inibição do crescimento micelial.

Metabólitos produzidos por *Bacillus* spp., como os lipopeptídeos, têm sido utilizados com eficiência na inibição de *S. sclerotiorum* (FERNANDO et al., 2007; YANG, et al.; 2009, ALVAREZ et al., 2011; MONTEIRO et al., 2013) e *B. cinerea* (OGENA, et al., 2004). Os ramnolipídeos também têm comprovado efeito inibitório contra *B. cinerea* (VARNIER et al., 2009), tanto por dano direto ao micélio quanto pela indução de resistência sistêmica (ISR).

A grande vantagem das nanopartículas e dos biossurfactantes quando usados no controle de fitopatógenos é a sua atuação em diversos mecanismos na célula dos organismos-alvo, obrigando os patógenos a adquirirem um grande número de mutações para conseguirem obter resistência a esses compostos, o que dificilmente pode ocorrer (CUEVAS, et al, 2015). Além da eficiência do controle, são características desejáveis de um bom fungicida a baixa toxicidade a humanos, a animais e a outros organismos não-alvo e baixo risco de contaminação de operadores e alimentos, além de baixo impacto ambiental. Essas características são geralmente encontradas tanto nas nanopartículas de prata e cobre quanto nos biossurfactantes, o que os torna candidatos em potencial para uso no controle fitossanitário.

Tendo-se em consideração as observações acima, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de nanopartículas de prata e cobre, o biossurfactante ramnolipídeo e um extrato livre de células de *B. subtilis* contendo os lipopeptídeos surfactina, fengicina e iturina na inibição do desenvolvimento dos fungos fitopatogênicos *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* e *P. pachyrhizi*, assim como na inibição da infecção causada por *B. cinerea* em pétalas de roseira (*Rosa hybrida*) e *S. sclerotiorum* em folhas de repolho (*Brassica oleracea* grupo Capitata).

### **4.3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.3.1. Produção do extrato bruto microbiano de *B. subtilis* LBBMA AP01**

O isolado *B. subtilis* LBBMA AP01 foi reativado em TSA a 30 °C por 24 horas e transferido para tubos de ensaio contendo 5 ml de caldo TSB (Tryptic Soy Broth, Difco, Maryland, EUA), seguindo-se incubação a 30 °C e 200 rpm por 24 horas. Uma alíquota da suspensão bacteriana (1 % v/v) foi transferida para um frasco tipo Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio mineral (conforme descrito no item 2.3.4). Os frascos foram incubados a 30 °C e 200 rpm por cerca de 24 horas. O inóculo foi preparado por centrifugação da cultura a 12.000 g por 10 minutos e as células foram lavadas em solução de NaCl (0,85 %) duas vezes e ressuspensas na mesma solução. Frascos do tipo Erlenmeyer de 1,0 L contendo 500 ml do meio descrito acima foram inoculados com um volume de inóculo suficiente para se obter uma densidade óptica a 600 nm correspondente a 0,05. Os frascos foram incubados a 30 °C sob agitação constante de 200 rpm por 24 horas.

Após 24 horas de incubação, a cultura foi centrifugada a 12.000 g por 20 minutos a 25 °C e o sobrenadante coletado e transferido para frascos tipo Scott. O extrato livre de células foi submetido à precipitação ácida, ajustando-se o pH para 2,0 com HCl 1 mol/L, seguindo-se armazenamento a 4 °C por 24 h. Após esse período, uma nova centrifugação foi realizada para recuperação do precipitado (12.000 g, 20 minutos, 4 °C). Os péletes foram ressuspensos em água destilada, ajustando-se o pH da solução para 7,0. A solução obtida foi submetida à liofilização e o extrato liofilizado foi armazenado a 4 °C.

#### **4.3.2. Síntese de nanopartículas de prata e cobre**

A síntese de nanopartículas de prata utilizando o extrato livre de células de *B. subtilis* MV 126P como agente redutor foi feita utilizando-se sobrenadante da cultura com 18 horas de incubação. A cultura foi centrifugada a 9.000 g e o sobrenadante utilizado para síntese das nanopartículas. A síntese foi realizada em frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 5 mL do sobrenadante, aos quais se adicionaram, separadamente, 20 mL de AgNO<sub>3</sub> (1,0 mmol/L). O pH foi ajustado para 10 utilizando-se NaOH 1,0 M e a mistura foi incubada a 60°C sob agitação constante de 200 rpm por 12 horas.

A síntese de nanopartículas de prata ou cobre por redução mediada por glicose foi realizada em frascos tipo Erlenmeyer de 50 mL, aos quais foram adicionados sequencialmente 25 mL de água Mili-Q e 0,2 g de glicose (VETEC, São Paulo, Brasil).

Após a dissolução completa da glicose, foram adicionados 50 µL de NaOH (1,0 mol/L), 1 mL de AgNO<sub>3</sub> na concentração de 66 mmol/L ou 1 ml de CuSO<sub>4</sub> a 10 mmol/L. As misturas foram incubadas sob agitação por 3 minutos a 80<sup>0</sup> C, congeladas em a -80 °C e liofilizadas em um liofilizador Liotop L101 por 24 horas.

#### **4.3.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de biossurfactantes e nanopartículas sobre o crescimento micelial de *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum*.**

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa e de Proteção de Plantas do Departamento de Fitopatologia da mesma instituição. Foram utilizados dois diferentes fitopatógenos pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Proteção de Plantas: *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

Propágulos dos dois isolados foram transferidos para placas de Petri (90 x15 mm) contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA, Sigma Aldrich), as quais foram mantidas em câmara BOD a 25 °C (*B. cinerea*) ou 22 °C (*S. sclerotiorum*) até o crescimento micelial atingir as bordas da placa. Após o crescimento, discos de micélio de 7,5 mm de diâmetro foram retirados assepticamente e transferidos para novas placas de Petri, seguindo-se incubação nas mesmas condições descritas acima.

As soluções contendo as nanopartículas e biossurfactantes foram adicionadas ao meio BDA antes de sua solidificação, utilizando-se 20 mL do meio de cultura em cada placa. Um disco de meio sólido contendo micélio de cada isolado fúngico foi repicado sobre o meio BDA acrescido dos agentes de controle avaliados sob diferentes concentrações, seguindo-se incubação em câmara BOD a 25 °C (*B. cinerea*) ou 22 °C (*S. sclerotiorum*), até o crescimento micelial do tratamento-controle atingir as bordas da placa.

Os tratamentos foram montados em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições para cada dose testada (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1:** concentrações finais dos produtos utilizados para ensaio de determinação concentração mínima inibitória (CMI) do crescimento miscelogenico de *B. cinerea* e *S. sclerotiorum in vitro*.

<b>Tratamento</b>	<b>Doses testadas (mg/L)</b>
<b>Concentração final do *I.a em meio BDA</b>	
1. Extrato bruto liofilizado de <i>B. subtilis</i> LBBMA AP01	**0, 25, 50, 100, 500, 1000
2. Ramnolipídeo	0, 6,5, 12,25, 32,5, 48,25, 65
3. Nanopartículas de prata produzidas com sobrenadante de <i>B.subtilis</i> MV126P	0, 5, 10, 20, 25, 50
4. Nanopartículas de prata produzidas com glicose	0, 5, 10, 20, 25, 50
5. Nanopartículas de prata produzidas com glicose + ramnolipídeo	0, 5, 10, 20, 25, 50 + 0, 2,7, 10,8, 13,5, 27
6. Sulfato de cobre	0, 12,5, 25, 125, 250, 375
7. Nitrato de prata	0, 5, 10, 20, 25, 50

\* Ingredientes ativos ( $Ag^+$ ,  $Cu^{2+}$  e ramnolipídeo).

\*\*Extrato bruto liofilizado (concentração do princípio ativo não determinada).

\*\*\*Fungicida misto com ingredientes ativos carbendazin, tebuconazole e cresoxin-metílico. Dose segundo recomendação do fabricante.

A avaliação dos tratamentos foi feita diariamente por meio da medição do diâmetro das colônias, até que o micélio fúngico da testemunha atingisse a borda da placa de Petri. O percentual de inibição do crescimento micelial (ICM %) foi calculado pela fórmula:

$$ICM (\%) = (C-T)*100/C$$

onde “C” é o diâmetro médio das colônias no tratamento-controle e “T” é o diâmetro médio das colônias nos tratamentos com os agentes de inibição avaliados.

#### **4.3.4. Efeito de nanopartículas de prata e biossurfactantes sobre a germinação de esporos de *Botrytis cinerea* e *Phakopsora pachyrhizi* e escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum***

Avaliou-se o efeito das nanopartículas e dos biossurfactantes sobre a germinação de esporos e escleródios dos fungos fitopatogênicos *Phakopsora pachyrhizi*, *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum* e subsequente formação de colônias. Os esporos de *P. pachyrhizi* foram obtidos de plantas oriundas de campos de cultivo na UFV com sintomas da doença e os de *B. cinerea* através do cultivo *in vitro*. Ambas as suspensões de esporos foram produzidas pela lavagem das folhas ou placas com água destilada, seguida da filtração em gaze para eliminar excesso de micélio. A concentração de esporos foi determinada por meio de contagem, utilizando-se um hemacitômetro (Precicolor-HBG). A concentração de esporos foi padronizada para  $3 \times 10^5$  esporos/mL.

Os escleródios de *S. sclerotiorum* foram produzidos utilizando-se 500 gramas de cenoura picada em forma de disco, previamente autoclavada, distribuídas em dois frascos Erlenmeyer de um litro. Discos de micélio do fungo, cultivado em BDA, foram transferidos para os frascos, seguindo-se incubação em temperatura ambiente até o aparecimento dos escleródios (cerca de 40 dias).

Após o preparo dos inóculos, 100 µl da suspensão de esporos de *P. pachyrhizi* ou de *B. cinerea* foram transferidos para placas de Petri de 60 x 15 mm. Os escleródios de *S. sclerotiorum* foram transferidos para placas de Petri de 90 x 15 mm. Foram utilizados 15 escleródios por placa.

As placas foram preparadas com meio ágar-água tratado com as seguintes soluções e suas respectivas concentrações finais com base na CMI determinada previamente (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2:** Concentrações finais dos produtos utilizados para ensaio de efeito sobre a germinação de esporos e escleródios dos fungos fitopatogênicos *Phakopsora pachyrhizi*, *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum* e subsequente formação de colônias

Tratamentos	Doses testadas com base na CMI do *Ia (mg/L)		
	<i>P. pachyrhizi</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
Testemunha	-	-	-
**BsAP01	100	100	100
Rhl	32,5	32,5	32,5
AgNPs - BsMV126P	25	25	25
AgNPs - Glu	25	25	25
AgNps - Glu + Rhl	10 + 5,4	10 + 5,4	10 + 5,4
CuSO <sub>4</sub>	125	125	250
AgNO <sub>3</sub>	25	25	25
***Lk	1,6	1,6	1,6

\* Ingredientes ativos (Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e ramnolípídeo).

\*\*Extrato bruto liofilizado (concentração do princípio ativo não determinada).

\*\*\*Locker: fungicida misto com ingredientes ativos carbendazin, tebuconazole e cresoxin-metílico. Dose segundo recomendação do fabricante.

Os tratamentos foram montados em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Após a inoculação, as placas de Petri foram incubadas em câmara BOD a 25 °C por 24 h (*P. pachyrhizi* e *B. cinerea*) ou 22 °C por 96 h (*S. sclerotiorum*).

As avaliações foram realizadas contando-se o número de esporos/escleródios germinados ou colônias formadas, utilizando-se microscópio (BRAX BTM-04) e microscópio estereoscópio (BRAX BTE-04). A germinação dos esporos foi determinada pela divisão das placas de Petri em quatro campos de observação, contando-se 25 esporos por campo, totalizando 100 esporos por placa. Já para os escleródios, foi contabilizado o número total de escleródios germinados por placa.

#### **4.3.5. Avaliação da efetividade de extratos microbianos e nanopartículas no controle da infecção por fungos fitopatogênicos *in vivo***

Para avaliar o efeito dos biossurfactantes e das nanopartículas sobre o controle dos fungos fitopatogênicos *in vivo*, folhas de repolho (*Brassica oleracea* grupo Capitata) e pétalas de rosa (*Rosa hybrida*), variedade Elisa (coloração rosa), foram acondicionadas em câmara úmida tipo “Gerbox” e inoculadas com um disco de micélio de *S. sclerotiorum* por folha ou pulverizadas com uma suspensão de esporos de *B. cinerea*. Anteriormente à inoculação dos isolados fitopatogênicos, as folhas e pétalas receberam uma pulverização dos tratamentos descritos a seguir.

Os tratamentos foram montados de forma similar ao teste *in vitro*, constando de um delineamento inteiramente casualizado com três repetições, sendo as folhas de repolho e pétalas de rosas pulverizadas com as soluções conforme a tabela 4.3.

**Tabela 4.3:** Concentrações finais dos produtos utilizados para ensaio do efeito dos biossurfactantes e das nanopartículas sobre o controle dos fungos fitopatogênicos *in vivo*, em folhas de repolho (*Brassica oleracea* grupo Capitata) e em pétalas de rosa (*Rosa hybrida*)

Tratamentos	Doses testadas com base na concentração mínima inibitória do *Ia (mg/L)	
	<i>B. cinerea</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
Testemunha	-	-
1. **Extrato bruto liofilizado de <i>B. subtilis</i> LBBMA AP01	100	100
2. Ramnolipídeo	32,5	32,5
3. Nanopartículas de prata produzidas com sobrenadante de <i>B. subtilis</i> MV126P	25	25
4. Nanopartículas de prata produzidas com glicose	25	25
5. Nanopartículas de prata produzidas com glicose + ramnolipídeo	10 + 5,4	10 + 5,4
6. Sulfato de cobre	125	250
7. Nitrato de prata	25	25
8. ***Lk	1,6	1,6

\* Ingredientes ativos (Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e ramnolipídeo).

\*\*Extrato bruto liofilizado (concentração do princípio ativo não determinada).

\*\*\*Locker: fungicida Dose segundo recomendação do fabricante.

Após a inoculação dos isolados fúngicos, as caixas “Gerbox” foram mantidas em temperatura controlada de 25 °C (*B. cinerea*) ou 22 °C (*S. sclerotiorum*) e avaliadas diariamente, quantificando-se o índice de doença pela incidência, ou seja, o percentual de indivíduos com sintomas da doença.

#### 4.3.6. Análises estatísticas.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o software ASSISTAT (Silva et al, 2016).

## 4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1. Efeito de nanopartículas e biossurfactantes sobre o crescimento micelial de *Botrytis cinerea* e *Sclerotinea sclerotiorum*

Todos os compostos e suas combinações demonstraram efeito inibidor significativo sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e *B. cinerea* quando comparados com a testemunha. A tabela 4.4 mostra o resultado das concentrações mínimas inibitórias para cada composto testado.

**Tabela 4.4:** concentrações mínimas inibitórias (CMI) sobre o crescimento miscelogenico de *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* *in vitro*

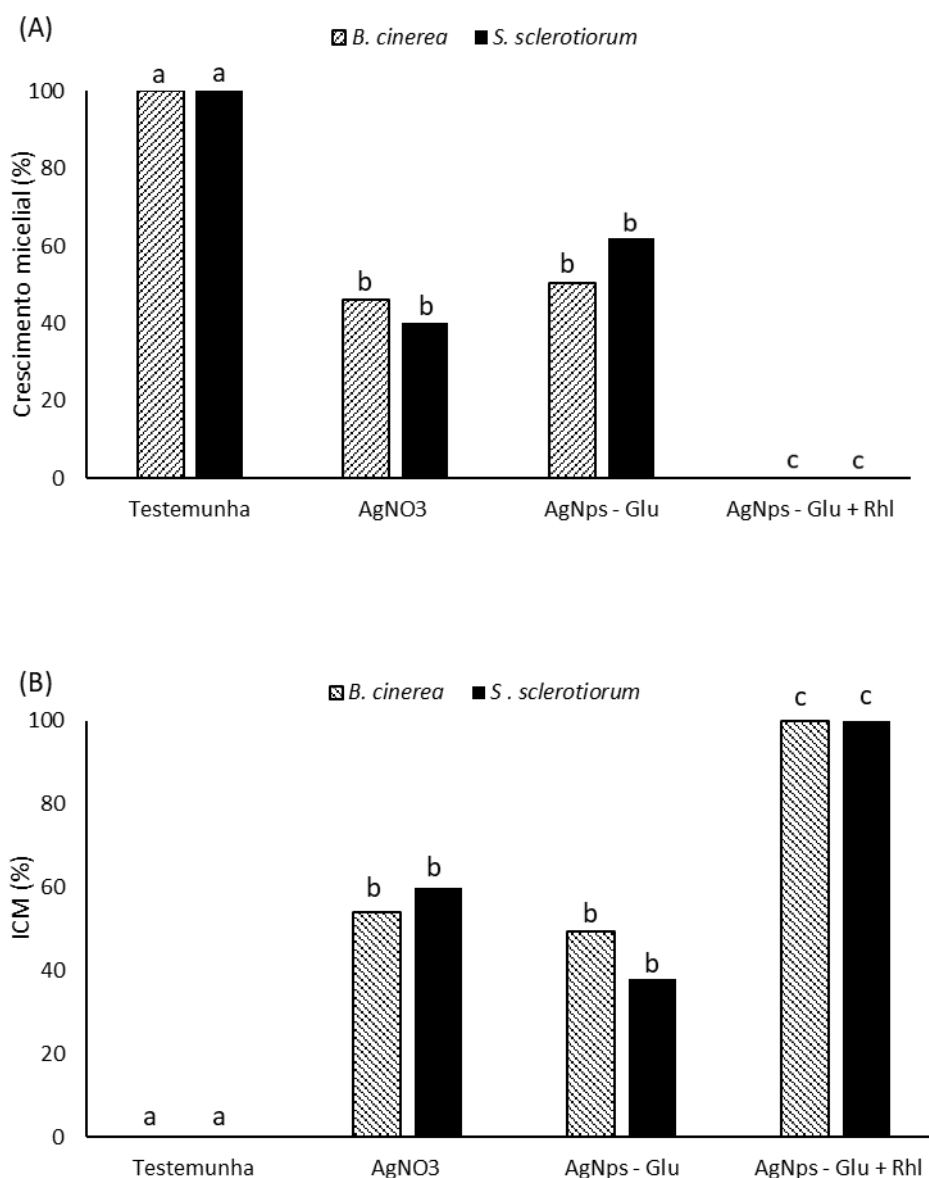
Tratamentos	Concentração Mínima Inibitória do *Ia (mg/L)	
	<i>B. cinerea</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
Testemunha	-	-
**BsAP01	100	100
Rhl	32,5	32,5
AgNPs - BsMV126P	25	25
AgNPs - Glu	25	25
AgNps - Glu + Rhl	10 + 5,4	10 + 5,4
CuSO <sub>4</sub>	125	250
AgNO <sub>3</sub>	25	25
***Lk	1,6	1,6

\* Ingredientes ativos (Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e ramnolipídeo).

\*\*Extrato bruto liofilizado, cuja concentração do princípio ativo não foi determinada.

\*\*\*Fungicida misto com ingredientes ativos carbendazin, tebuconazole e cresoxin-metílico. Dose segundo recomendação do fabricante.

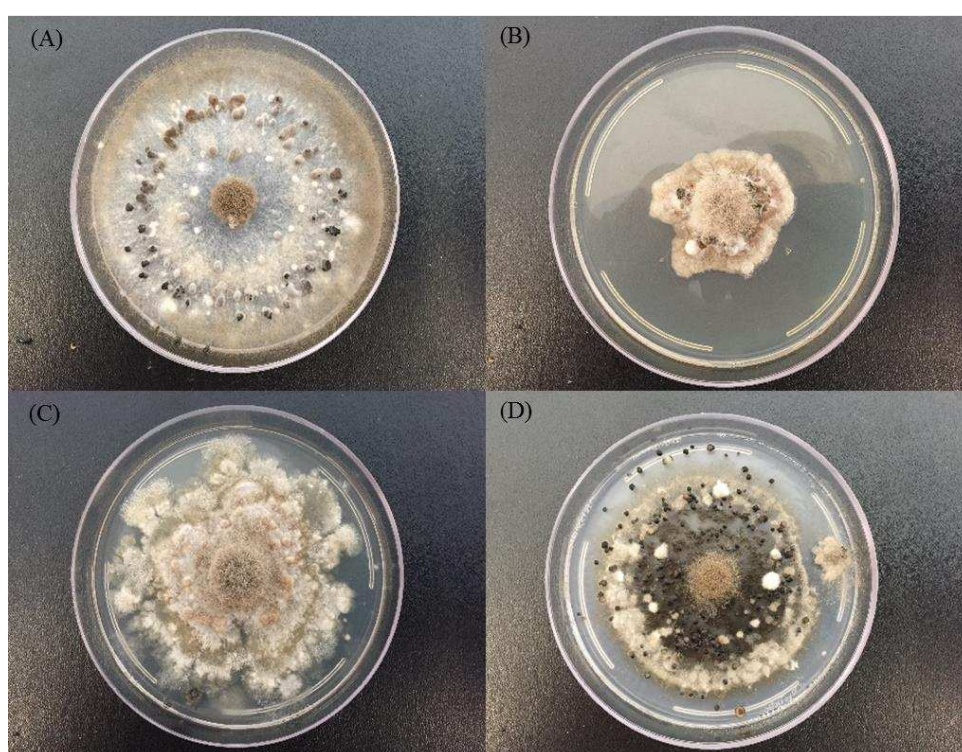
O extrato bruto de *B subtilis* LBBMA AP 01, ramnolipídeo e as nanopartículas de prata apresentaram uma elevada atividade de inibição sobre os isolados fúngicos em baixas concentrações. Quando as concentrações mínimas inibitórias dos tratamentos que possuíam prata em sua composição foram comparados entre si, houve efeito significativo quando as AgNPs foram combinadas com Rhl, em relação aos resultados de CMI obtidos quando os mesmos foram utilizados separadamente (Figuras 4.1 A e B e 4.2).



**Figura 4.1:** Avaliação do crescimento micelial *in vitro* dos fungos fitopatogênicos *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* na presença de agentes inibidores contendo apenas prata como ingrediente ativo na concentração de 10 mg/L. (A) Crescimento micelial; (B) Inibição do Crescimento Micelial (ICM %). Placas contendo meio BDA foram tratadas com nanopartículas de prata produzidas com glicose (AgNps – Glu); nanopartículas de prata produzidas com glicose e ramnolípídeo como agente estabilizante (AgNps – Glu+RhI). Como controle, foi utilizados apenas o meio BDA sem tratamento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O efeito combinado das AgNPs e do ramnolipídeo foi mais evidente na inibição do crescimento micelial de *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*, sendo as doses dos princípios ativos menores (CMI = 10mg/L de Ag na forma de AgNPs produzidas com glicose e 5,4 mg/L de Rhl) do que nos tratamentos em que foram utilizados separadamente (CMI = 25 mg/L de Ag e 32,5 mg/L de Rhl).

Os fungos *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* apresentaram elevada sensibilidade aos tratamentos que possuíam prata em sua composição. Todos os tratamentos com AgNPs apresentaram alto índice de ICM sobre fungos.



**Figura 4.2:** Efeito das nanopartículas de prata (AgNps) e ramnolipídeo (Rhl), aplicados separadamente ou em combinação, sobre o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*. (A) Testemunha; (B) nanopartículas de prata produzidas com glicose e ramnolipídeo como agente estabilizante (AgNps – Glu+Rhl); (C) nanopartículas de prata produzidas com glicose (AgNps – Glu); (D) ramnolipídeo (Rhl). As doses dos princípios ativos são descritas na tabela 4.2.

#### **4.4.2. Efeito de nanopartículas e biossurfactantes sobre a germinação de esporos de *Botrytis cinerea* e *Phakopsora pachyrhizi* e escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum***

Todos os agentes de controle avaliados reduziram significativamente a germinação *in vitro* de esporos de *P. pachyrhizi*. (Tabela 4.5).

Houve redução significativa da germinação de esporos e a consequente formação de colônias de *B. cinerea* na presença de todos os agentes de controle, com destaque para o extrato bruto de *B. subtilis* LBBMA AP 01, as AgNPs produzidas usando-se glicose como agente redutor e estabilizadas com ramnolipídeo, o AgNO<sub>3</sub> e o fungicida comercial.

Foi identificado efeito significativo dos compostos avaliados sobre a inibição da germinação micelogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* (Tabela 4.5). No entanto, comparativamente ao efeito observado sobre a germinação de esporos das outras duas espécies fúngicas avaliadas, houve uma menor eficiência dos compostos testados na inibição da germinação de escleródios. Essas estruturas são altamente resistentes à penetração de compostos antimicrobianos, permanecendo viáveis por longos períodos (SUMIDA et al., 2015). Apresentam ainda variação de sensibilidade aos compostos utilizados no controle de fungos fitopatogênicos produtores de tais estruturas, inclusive com o surgimento de resistência genética a algumas moléculas, em decorrência do surgimento de diferentes raças fisiológicas (MUELLER et al., 2002). A título de exemplo, COSTA & COSTA (2004), ao avaliarem diferentes fungicidas para inibição da germinação de escleródios, reportaram que nenhum deles foi capaz de inibir 100% da germinação miscelogênica de *S. sclerotiorum*.

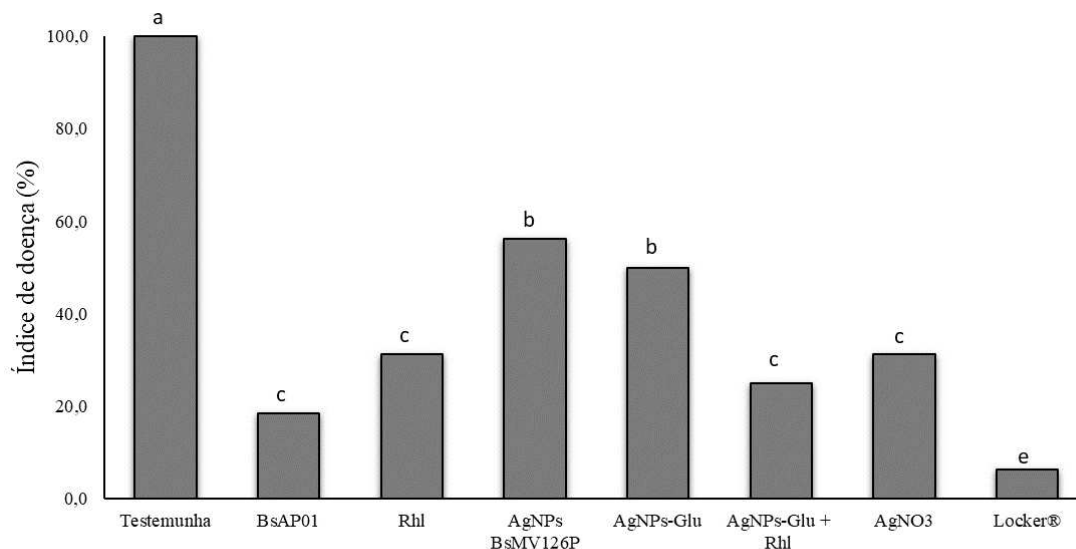
**Tabela 4.5:** Efeito de nanopartículas e biossurfactantes sobre a germinação/formação de colônias de esporos de *P. pachyrhizi* e *B. cinerea* e germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*

Tratamentos	% Germinação/formação de colônias		
	<i>P. pachyrhizi</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
Testemunha	61,3 a	78,4 a	91,1 a
BsAP01	1,0 e	4,6 c	35,6 c
Rhl	5,6 d	16,1 b	33,6 b
AgNPs - BsMV126P	9,0 c	23,3 b	53,3 b
AgNPs - Glu	11,6 c	20,0 b	55,6 b
AgNps - Glu + Rhl	4,0 d	3,5 c	42,2 b
AgNO <sub>3</sub>	9,0 c	6,0 c	28,6 c
Lk	0,0 e	0,0 c	13,1 d

Extrato bruto de *B. subtilis* LBBMA AP01 (BsAP01); Ramnolipídeo (Rhl); nanopartículas de prata produzidas com sobrenadante de *B. subtilis* MV 126 P (AgNps – BsMV 126P) ou glicose (AgNps – Glu); nanopartículas de prata produzidas com glicose e ramnolipídeo como agente estabilizante (AgNps – Glu+Rhl). Como controles, foram utilizados apenas o meio ágar- água sem tratamento; nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>); fungicida Locker® (carbendazin, tebuconazole e cresoxin-metfílico). As doses dos princípios ativos são descritas na tabela 4.2. Médias das colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott knott (5 % de probabilidade).

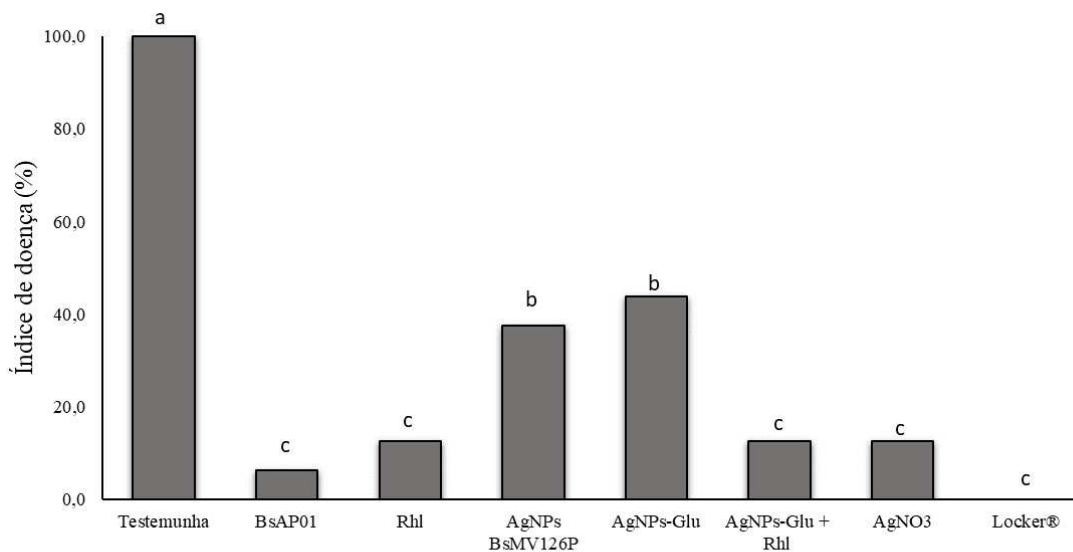
#### 4.4.3. Avaliação da efetividade de extratos microbianos e nanopartículas no controle de fitopatógenos *in vivo*

Dois dias após a inoculação de esporos de *B. cinerea*, as pétalas de rosa (*Rosa hybrida*) já apresentavam sintomas da infecção. Decorridos 6 dias, observou-se 100% de incidência de mofo cinzento. Houve diferença significativa do índice de doença nas pétalas de rosas entre os tratamentos aplicados (Figura 4.3). O extrato de LBBMA AP01, o ramnolipídeo e as AgNPs mostraram-se eficientes no controle do mofo cinzento.



**Figura: 4.3:** Efeito dos diferentes tratamentos sobre o índice da doença mofo cinzento, provocada pelo fitopatógeno *B. cinerea*, em pétalas de rosa. Antes da inoculação de *B. cinerea*, pétalas de rosa foram tratadas com: Extrato bruto de *B. subtilis* LBBMA AP01 (BsAP01); ramnolipídeo (Rhl); nanopartículas de prata produzidas com sobrenadante de *B. subtilis* MV 126 P (AgNps – BsMV 126P) ou glicose (AgNps – Glu); nanopartículas de prata produzidas com glicose e ramnolipídeo como agente estabilizante (AgNps – Glu+Rhl). Como controles, foram utilizados apenas água destilada (testemunha); nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>); fungicida Locker® (carbendazim, tebuconazole e Cresoxin-Metílico). As doses dos princípios ativos são descritas na tabela 4.3. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As folhas de repolho (*Brassica oleracea* grupo Capitata) apresentaram 100 % de incidência de mofo branco causada por *S. sclerotiorum* no tratamento controle, doze dias após a inoculação. Todos os compostos e suas combinações reduziram significativamente a incidência da doença. Comparando-se os tratamentos com nanopartículas de prata, obteve-se maior eficiência no controle da doença no tratamento com AgNPs sintetizadas com glicose e estabilizadas com ramnolipídeos, possivelmente como resultado da ação conjunta dos dois agentes inibidores presentes na formulação. Não houve diferença significativa entre as eficiências no controle da doença obtidas nos tratamentos com extrato de *B. subtilis* LBBMA AP01, ramnolipídeo, AgNPs sintetizadas com glicose estabilizadas com ramnolipídeos, sal de prata (AgNO<sub>3</sub>) e o fungicida comercial (Figura 4.4).



**Figura 4.4:** Efeito dos diferentes tratamentos *in vivo* sobre o fitopatógeno *S. sclerotiorum* em folhas de repolho. Antes da inoculação de *S. sclerotiorum*, folhas de repolho foram tratadas com: Extrato bruto de *B. subtilis* LBBMA AP01 (BsAP01); Ramnolipídeo (Rhl); nanopartículas de prata produzidas com sobrenadante de *B. subtilis* MV 126 P (AgNps – BsMV 126P) ou glicose (AgNps – Glu); nanopartículas de prata produzidas com glicose e ramnolipídeo como agente estabilizante (AgNps – Glu+Rhl). Como controles, foram utilizados apenas água destilada (testemunha); nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>); fungicida Locker® (carbendazin, tebuconazole e Cresoxin-Metílico). As doses dos princípios ativos são descritas na tabela 4.3. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

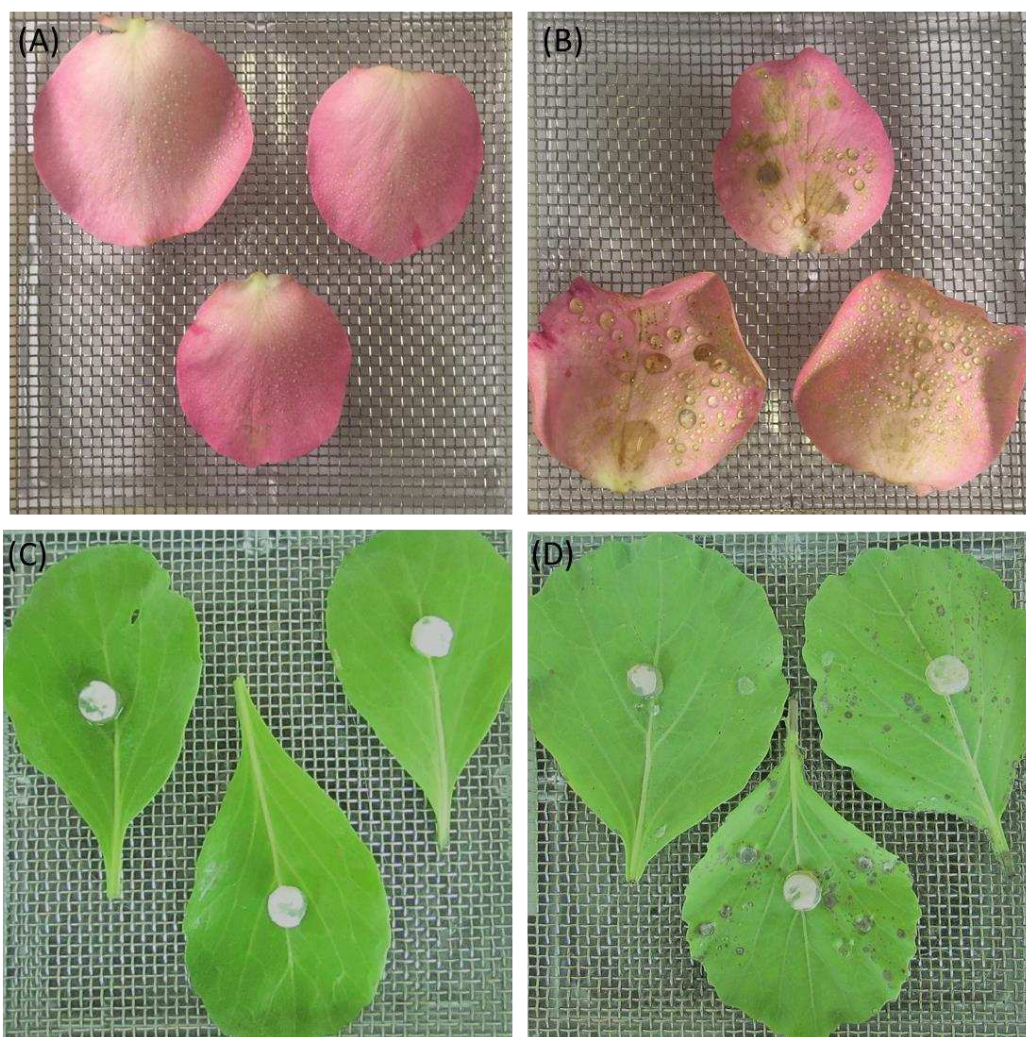
O ramnolipídeo e o extrato de LBBMA AP 01 se mostraram eficientes no controle dos fitopatógenos nas diversas etapas deste trabalho. Segundo YAN et al. (2015), ramnolipídeos podem causar injúrias na célula fúngica, cujo dano pode resultar da ruptura da bicamada de fosfolípidos da membrana celular decorrente de sua atividade surfactante, com conseqüente extravasamento de eletrólitos. O efeito combinado das AgNps + ramnolipídeo observado sobre os fungos fitopatogênicos estudados neste trabalho, pode ser explicado provavelmente pelo dano direto à membrana provocado pelo biossurfactante, o que pode facilitar a entrada das AgNps nas células fúngicas e, assim, aumentar sua ação antimicrobiana (YAN et al., 2015).

Os lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* são conhecidos por apresentarem vários efeitos sobre as células de fitopatógenos (ONGENA & JACQUES 2008), incluindo diferentes tipos de interações com a membrana celular. Essas interações podem levar à formação de poros e causar desequilíbrio osmótico, resultando em morte celular. Os

vários espectros de atividades dos lipopeptídeos parecem estar ligados aos seus respectivos mecanismos de ação sobre as membranas biológicas de organismos fitopatogênicos (PEREZ-GARCIA et al., 2011). No entanto, poucos estudos relatam o efeito combinado de diferentes famílias de lipopeptídeos sobre patógenos de plantas. LIU et al. (2014) demonstraram um potencial efeito sinérgico entre fengicina e iturina sobre a inibição do fungo *Fusarium sambucinum*, não havendo efeito inibitório dessas substâncias quando avaliadas separadamente. *B. subtilis* LBBMA AP 01 produz durante o seu crescimento três lipopeptídeos (iturina, fengicina e surfactina), o que pode estar relacionado com a elevada efetividade do extrato obtido a partir do cultivo desse isolado no controle das diferentes espécies fúngicas avaliadas nesse trabalho.

Além do dano direto ao micélio de fungos, os biossurfactantes podem atuar indiretamente no controle de doenças de plantas, ao induzir o mecanismo de resistência sistêmica (ISR). Em tomate e feijão, ONGENA et al. (2007) demonstraram o papel da surfactina e fengicina na ISR, observando mudanças metabólicas nas plantas quando tratadas com os lipopeptídeos purificados. As pétalas de rosas e folhas de repolho, quando tratadas com o extrato de LBBMA AP 01, se mostraram muito saudáveis e com baixa incidência de doença, o que leva à hipótese de uma combinação de fatores no controle (ação direta e IRS).

Compostos em escala nanométrica têm comprovado efeito antifúngico contra patógenos de plantas (KIM et al., 2012; OUDA, 2014; VELMURUGAN et al., 2014), seja por ação direta no micélio ou sobre a germinação de esporos. O modo de ação depende de alguns fatores, como concentração e o tamanho das nanopartículas. IVASK et al. (2014), estudando a influência do tamanho de nanopartículas de prata sobre sua atividade, observaram que quanto maior o tamanho das nanopartículas, menor é a sua efetividade como agente antimicrobiano. Quanto menor a nanopartícula, maior a sua superfície de contato com a célula alvo, o que pode induzir a geração de espécies reativas de oxigênio ou facilitar sua penetração através da membrana, liberando seu princípio ativo (íons  $\text{Ag}^+$ ) no interior da célula.



**Figura 4.5:** Imagens demonstrando o efeito combinado das nanopartículas de prata produzidas com glicose (AgNps-Glu) e ramnolípídeo (Rhl) no controle de *B. cinerea* e *S sclerotiorum* e a fitotoxicidade gerada por  $\text{AgNO}_3$  sobre as pétalas de rosa e folhas de repolho. (A) Pétalas de rosas tratadas com AgNps – Glu + Rhl; (B) fitotoxicidade de  $\text{AgNO}_3$  sobre pétalas de rosas; (C) folhas de repolho tratadas com AgNps – Glu + Rhl e (D) fitotoxicidade de  $\text{AgNO}_3$  sobre folhas de repolho. As doses dos princípios ativos são descritas na tabela 4.3.

O  $\text{AgNO}_3$  demonstrou bom desempenho no controle dos fitopatógenos, mas na concentração utilizada (25 mg/L) resultou no aparecimento de sintomas de fitotoxicidade (Figura 4.5 B e D). Nos tratamentos em que a prata foi utilizada na forma de nanopartículas, obteve-se controle satisfatório das doenças sem a ocorrência de sintomas de fitotoxicidade (Figura 4.5 A e C). Um dos mecanismos pelos quais a prata pode levar ao surgimento de sintomas de fitotoxicidade é a sua capacidade de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no organismo, levando a estresse oxidativo. As ROS danificam componentes celulares como proteínas, lipídeos e DNA e podem resultar na

morte de tecidos ou mesmo de toda a planta (KARUPPANAPANDIAN, T. et al, 2011; TRIPATHI et al., 2017). A hipótese para explicar a ausência de fitotoxicidade quando o metal é aplicado na forma de nanopartículas é de que os íons  $\text{Ag}^+$  são liberados lentamente das nanopartículas, em concentrações grandes o suficiente para o controle de patógenos, mas não para causar efeito fitotóxico. GORKA e LIU (2016) demonstraram que AgNPs também podem causar fitotoxicidade, mas o efeito depende da concentração, taxa de liberação e penetração de íons  $\text{Ag}^+$  dentro da célula. Esse efeito não foi observado no presente trabalho.

#### 4.5. CONCLUSÕES.

Os compostos avaliados nesse trabalho como agentes inibidores de *P. pachyrhizi*, *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* foram considerados eficazes. As AgNPs, ramnolipídeo, extrato bruto de *B. subtilis* isolado LBBMA AP 01 e AgNPs estabilizadas com ramnolipídeos, demonstraram elevado efeito inibidor do crescimento micelial, da germinação de esporos e escleródios e da intensidade das doenças mofo cinzento em pétalas de rosa (provocada por *B. cinerea*) e mofo branco em folhas de repolho (*S. sclerotiorum*). A otimização da produção desses compostos, com consequente redução dos custos e aumento do rendimento dos processos, pode resultar em sua utilização como alternativa viável para o controle de enfermidades de plantas. Os compostos avaliados frente ao fungicida comercial apresentam potencial para gerar produtos fitossanitários de elevada eficiência, baixo custo e reduzido impacto ambiental e sobre a saúde de trabalhadores rurais e consumidores. Outros estudos devem ser conduzidos no sentido de melhorar a eficiência do processo produtivo e de se avaliarem questões relativas a toxicidade, impacto ambiental e estabilidade das formulações avaliadas no trabalho.

#### 4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ALVAREZ, F.; CASTRO, M.; PRINCIPE, A.; BORIOLI, G.; FISCHER, S.; MORI, G.; JOFRE, E. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of *Sclerotinia* stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, v. 112, p. 159–174, 2011.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (eds.) Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: **Editora Agronômica Ceres**. 4. ed., v.1, 704 p., 2011.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (eds.). Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas. São Paulo: **Editora Agronômica Ceres**, 5. ed., v. 2, 820 p., 2016.
- BERGAMIN FILHO, A.; KITAJIMA, E. W. História da Fitopatologia. In AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (eds.) Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: **Editora Agronômica Ceres**. 4. ed., v.1, cap.1, p. 3-17, 2011.
- COSTA, J.R.; COSTA, J.L. da S. Efeito da aplicação de fungicidas no solo sobre a germinação carpopôgica e miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.34, p.133-138, 2004
- CUEVAS, N.; DURÁN, M.; DIEZ, C.; TORTELLA, G. R.; RUBILAR, O. Extracellular biosynthesis of copper and copper oxide nanoparticles by *Stereum hirsutum*, a native white-rot fungus from Chilean forests. *Journal of Nanomaterials*, p. 1–7, 2015.
- FRAC-Comitê de Ação à Resistência de Fungicidas. Disponível em: <http://www.frac-br.org/> Acessado em: 01 de setembro de 2017.
- GOND, S. K.; BERGEN, M. S.; TORRES, M. S.; WHITE JR, J. F. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological Research*, v. 172, p. 79–87, 2015.

- GORKA, D. E, & LIU, L. Effect of Direct Contact on the Phytotoxicity of Silver Nanomaterials. **Environment Science Technology**, v. 50, n.19, p. 10370–10376, 2016.
- GUO, Q.; DONG, W.; LI, S.; LU, X.; WANG, P.; ZHANG, X.; WANG, Y.; MA, P. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. **Microbiological Research**, v. 169, p. 533–540, 2014.
- HULTBERG, M.; ALSBERG, T.; KHALIL, S.; ALSANIUS, B. Suppression of disease in tomato infected by *Pythium ultimum* with a biosurfactant produced by *Pseudomonas koreensis*. **BioControl**, v. 55, p. 435–444, 2010.
- IVASK, A.; KURVET, I.; KASEMETS, K.; BLINOVA, I.; ARUOJA, V.; et al. Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells *in vitro*. **PLoS ONE**, v. 9, n.7, p.1-14, 2014.
- KARUPPANAPANDIAN, T. MOON, J.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. Reactive oxygen species in plants: their 34 generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 709, 2011.
- KIM, S. W.; JUNG, J. H.; LAMSAL, K.; KIM, Y.S.; MIN, J. S; LEE, Y. S. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. **Micobiology**, v. 40, p. 53-58.
- LIU, J.; HAGBERG, I.; NOVITSKY, L.; HADJ-MOUSSA, H.; AVIS, T. J. Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. **Fungal biology**, v. 118, p. 855 – 861, 2014.
- MIN, J.S.; KIM, K. S.; KIM, S.W.; et al. Effects of colloidal silver nanoparticles on Sclerotium-forming phytopathogenic fungi. **Plant Pathology Journal**, v. 25, p. 376-380, 2009.
- MUELLER, D. S.; DERKSEN, R. C.; OZKAN, E. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean. **Plant Disease**, 86, n. 1, p. 26-31, 2002.

- ONGENA, M., JOURDAN, E., ADAM, A., PAQUOT, M., BRANS, A., JORIS, B., et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environment Microbiology**, n.9, p. 1084–1090, 2007.
- ONGENA, M., and JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, n. 16, p.115–125, 2008
- OUDA, M. S. Antifungal Activity of Silver and Copper Nanoparticles on Two Plant Pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. **Research Journal of Microbiology**, n. 9, p. 34-42, 2014.
- PEREIRA, F. S.; BORGES, L. P.; GUIMARÃES, G.R.; SILVA, A.; GONÇALVES, R. N.; CARVALHO, L. R., TEIXEIRA, R.T. Estratégias de controle de mofo branco do feijoeiro. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n.17, p. 1354-135, 2013.
- PEREZ-GARCIA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 187-193, 2011.
- SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agriculture**, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.
- SINDIVEG: Setor de defensivos agrícolas registra queda nas vendas em 2016. Disponível em: <http://sindiveg.org.br>. Acessado em 15/06/2017.
- SINGH, R., SHEDBALKAR, U.U., WADHWANI, S.A., CHOPADE, B.A. Bacteriogenic silver nanoparticles : synthesis , mechanism , and applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 99, n.11, p. 4579-4593, 2015.
- SUMIDA, C. H., CANTERII, M. G., PEITLI, D. C. and TIBOLLA, F. Chemical and biological control of *Sclerotinia* stem rot in the soybean crop. **Ciência Rural**, v.45, n.5, p.760-766, 2015
- TRAN, H., Ficke, A., ASIIMWE, T., HOFTE, M., and RAAIJMAKERS, J.M. Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. **New Phytopathology**, n. 175 p.731–742, 2007.

- TRIPATHI, D. K.; TRIPATHI, A.; SINGH, S.; SINGH, Y.; VISHWAKARMA K. Uptake, Accumulation and Toxicity of Silver Nanoparticle in Autotrophic Plants, and Heterotrophic Microbes: A Concentric Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n.7, p. 1-16, 2017.
- VARNIER, A.; SANCHEZ, L.; VATSA, P. & DOREY, S. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. **Plant Cell and Environment**, v.32, P. 178–193, 2009.
- VELMURUGAN, P., IYDROOSE, M., MOHIDEEN, M.H.A.K., MOHAN, T.S., CHO, M., OH, B.T. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus subtilis* EWP-46 cell-free extract and evaluation of its antibacterial activity. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 37, n. 8, p. 1527-1534, 2014.
- YAN, F.; XU, S.; GUO, J.; CHEN, Q.; MENG, Q.; ZHENG, X. Biocontrol of post-harvest *Alternaria alternata* decay of cherry tomatoes with rhamnolipid and possible mechanisms of action. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 95, p.1469–1474, 2015.