



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

MATHEUS VICTOR RUFINO AREAL

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVs) EMITIDOS POR *Bacillus* sp. NO
CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS**

FORTALEZA
2019

MATHEUS VICTOR RUFINO AREAL

COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVs) EMITIDOS POR *Bacillus* sp. NO
CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento de Química Analítica e Físico-química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador pedagógico: Prof. Dr^a. Mary Anne Sousa Lima.

Orientador profissional: Dr^a. Christiana de Fátima Bruce da Silva.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A724c Areal, Matheus Victor Rufino.
Compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por *Bacillus* sp. no controle biológico de fitopatógenos /
Matheus Victor Rufino Areal. – 2020.
45 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Química, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima.

Coorientação: Profa. Dra. Christiana de Fátima Bruce da Silva.

1. Biocontrole. 2. Compostos orgânicos voláteis (COVs). 3. *Bacillus* sp.. 4. *Fusarium oxysporum* f. sp.
cubense. 5. *Colletotrichum* sp. I. Título.

CDD 540

MATHEUS VICTOR RUFINO AREAL

COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVs) EMITIDOS POR *Bacillus* sp. NO
CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento de Química Analítica e Físico-química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Mary Anne Sousa Lima (Orientador pedagógico)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr^a. Christiana de Fátima Bruce da Silva (Orientador profissional)
Embrapa Agroindústria Tropical

Prof. Dr^a. Antônia Torres Ávila Pimenta
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha mãe, Maria do Socorro Rufina Areal e à minha irmã, Larissa Victória Rufino Areal. Sem o amor, estímulo e carinho de vocês, essa conquista não seria possível!

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente aos meus pais e à minha irmã, pelo amor, cuidado e incentivo transmitidos ao longo dessa jornada que serviram como base para que eu pudesse alcançar os meus objetivos. Essa vitória é para vocês e graças a vocês.

À professora Mary Anne Sousa Lima pela concessão da primeira oportunidade na área científica, pelos ensinamentos, conselhos e incentivos transmitidos ao longo dessa jornada.

À professora Antônia Torres Ávila Pimenta pela cordialidade, carinho, otimismo e pelos conhecimentos humanos e científicos compartilhados.

À Dr^a. Christiana Bruce pela confiança ao me conceder a oportunidade de realizar o trabalho de conclusão de curso no Laboratório de Patologia Pós-colheita, da Embrapa Agroindústria Tropical-CE.

À Marília Mota, minha melhor amiga e namorada, pela compreensão, amizade e pelo amor compartilhados durante essa caminhada repleta de companheirismo.

Aos meus velhos amigos, André Salgado, Igor Rodrigo, Bárbara Viana, Vivian Silva, Debora Ferreira e Cleysla Carvalho pela cumplicidade, amizade e bons momentos ao longo de tantos anos de amizade.

Aos amigos que a universidade me presenteou: Rodrigo Maciel, Daiane de Freitas, Vitor Costa, Monilson Pinheiro, Pablio Abreu, Ana Gabrielle, Ana Clara, Clinton Simplicio, Thiago Vasconcelos, Victor Hugo, Jair Mateus, Manuela Santos, João Felipe, Carla Manuela, Neilyane Fernandes, Erivelton Menezes, Lidiane Bittencourt, Monica Machado e Angélica Freitas pela amizade, pelos conselhos e momentos compartilhados.

Aos amigos de laboratório e da vida: João Evangelista, Debora Sousa, Davi Dantas, Fernanda Gabriela e Thaizy Martins pela amizade, apoio, incentivo, ensinamentos, conselhos e momentos de descontração que tornaram a caminhada mais leve, sem vocês, o fardo seria muito mais pesado.

Aos integrantes do Laboratório de Patologia Pós-colheita, da Embrapa Agroindústria Tropical-CE, pela ajuda, paciência e por todos os ensinamentos humanos e científicos transmitidos no decorrer do estágio.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa conquista, meus sinceros agradecimentos.

Obrigado!

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis. (José de Alencar).

RESUMO

Bactérias do gênero *Bacillus* desempenham um papel importante como agentes de biocontrole, devido à produção de compostos orgânicos voláteis (COVs), comumente relatados como inibidores do crescimento micelial de diferentes patógenos fúngicos. O presente trabalho teve como objetivo a identificação estrutural e avaliação do potencial antifúngico dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por uma cepa bacteriana de *Bacillus* sp. (LPPC265), isolada da rizosfera de bananeiras, frente aos patógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (LPPC130) e *Colletotrichum* sp. (LPPC388). O experimento de antagonismo foi realizado através do método do pareamento de placas, contendo o antagonista *Bacillus* sp. (LPPC265) e um patógeno (LPPC130 ou LPPC388). Os resultados revelaram que os COVs de *Bacillus* sp. (LPPC265) atuaram na inibição dos fungos LPPC130 e LPPC388 em 44,8% e 55,8%, após 6 e 4 dias de incubação, respectivamente. A obtenção dos COVs foi realizada através da coleta por microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME), e a análise foi realizada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM). A utilização da biblioteca de dados NIST, aliada à análise comparativa dos índices de Kovats e espectros de massas, possibilitou a caracterização de onze compostos voláteis emitidos pela bactéria, dos quais se destacam o 2-metil-1,3-butadieno, o 3-metil-1-butanol, a metilisobutilcetona, o ácido butanóico, o ácido 3-metil-butanóico e o ácido 2-metil-butanóico, que já possuem relatos na literatura como substâncias importantes no biocontrole de fitopatógenos.

Palavras-chave: Biocontrole. Compostos orgânicos voláteis (COVs). *Bacillus* sp. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Colletotrichum* sp.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Bacillus* play an important role as biocontrol agents due to the production of volatile organic compounds (VOCs), commonly reported as mycelial growth inhibitors of different fungal pathogens. The objective of the present work was the structural identification and evaluation of the antifungal potential of volatile organic compounds (VOCs) emitted by a bacterial strain of *Bacillus* sp. (LPPC265), isolated from the banana rhizosphere, against the pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (LPPC130) and *Colletotrichum* sp. (LPPC388). The antagonism experiment was performed by the plate pairing method, containing the antagonist *Bacillus* sp. (LPPC265) and a pathogen (LPPC130 or LPPC388). The results revealed that the VOCs of *Bacillus* sp. (LPPC265) inhibited the fungi LPPC130 and LPPC388 by 44.8% and 55.8%, after 6 and 4 days of incubation, respectively. The VOCs were obtained by headspace mode solid-phase microextraction (HS-SPME), and the analysis was performed using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC-MS). The use of the NIST data library, combined with a comparative analysis of Kovats indices and mass spectra, allowed the characterization of eleven volatile compounds emitted by the bacterium, of which we highlight 2-methyl-1,3-butadiene, 3-methyl-1-butanol, methylisobutylketone, butanoic acid, 3-methylbutanoic acid and 2-methylbutanoic acid, which are already reported in the literature as important substances in the biocontrol of phytopathogens.

Keywords: Biocontrol. Volatile organic compounds (VOCs). *Bacillus* sp. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Colletotrichum* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Sintomas internos (A) e externos (B) do “Mal do Panamá” em bananeira	12
Figura 2	– Sintomas da “antracnose” em frutos de banana e mamão, respectivamente	13
Figura 3	– Compostos orgânicos voláteis (COVs) de <i>Trichoderma viride</i> e <i>Trichoderma asperellum</i> relatados com atividade antimicrobiana	15
Figura 4	– Compostos orgânicos voláteis (COVs) de espécies de <i>Bacillus</i> com atividade antimicrobiana e promotora do crescimento de plantas	15
Figura 5	– Estruturas químicas dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por espécies de <i>Bacillus</i> com potencial biotecnológico e atividade biológica	21
Figura 6	– Etapas envolvidas na microextração em fase sólida dos compostos orgânicos voláteis (COVs)	24
Figura 7	– Cepas de: a) <i>Bacillus</i> sp. (LPPC265); (b) <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (LPPC130) e c) <i>Colletotrichum</i> sp. (LPPC388) utilizadas em todos os experimentos	27
Figura 8	– Teste de antagonismo dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de <i>Bacillus</i> sp. (LPPC265) versus <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (LPPC130) e <i>Colletotrichum</i> sp. (LPPC388) segundo o método de pareamento de placas	29
Figura 9	– Representação da metodologia empregada na análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pelo isolado de <i>Bacillus</i> sp. LPPC265	31
Figura 10	– Inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (LPPC130), durante 6 dias de incubação (a) e <i>Colletotrichum</i> sp.	

(LPPC388), ao longo de 4 dias de experimento (b) pela ação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Bacillus* sp. (LPPC265) 33

Figura 11 – Estruturas químicas dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Bacillus* sp. (LPPC265) 37

Figura 12 – Espectros de massas dos compostos: A) 2-Metil-1,3-butadieno; B) *trans*-2-Hexeno; C) 3-Metileno-1-penteno; D) 3-Metil-1-butanol; E) Metilisobutilcetona; F) 2-Metil-propanoato de etila; G) Ácido butanóico; H) Ácido 3-metil-butanóico; I) Ácido 2-metil-butanóico; J) 1-Cloro-hexano; K) 1-Hexanol 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por espécies de <i>Bacillus</i> com potencial biotecnológico e atividade biológica para diferentes patógenos	19
Tabela 2 – Composição dos meios de cultura BDA, 523 e caldo nutriente utilizados em todos os ensaios	28
Tabela 3 – Compostos orgânicos voláteis (COVs) identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) na cultura de <i>Bacillus</i> sp. (LPPC265)	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Considerações gerais sobre o gênero <i>Bacillus</i>	17
2.2 Levantamento bibliográfico dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por espécies de <i>Bacillus</i> com potencial biotecnológico	18
2.3 Aspectos teóricos da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	22
2.4 Extração dos compostos voláteis por microextração em fase sólida	23
2.5 Índice de Kovats (KI)	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Origem, preservação e cultivo dos microrganismos	26
3.1.1 Isolado bacteriano de <i>Bacillus</i> sp. (LPPC265)	26
3.1.2 Isolados fúngicos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (LPPC130) e <i>Colletotrichum</i> sp. (LPPC388)	26
3.2 Influência dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de <i>Bacillus</i> sp. (LPPC265) no crescimento micelial dos patógenos <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (LPPC130) e <i>Colletotrichum</i> sp. (LPPC388)	28
3.3 Análise dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por <i>Bacillus</i> sp. (LPPC265) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Influência dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de <i>Bacillus</i> sp. (LPPC265) frente aos fungos <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (LPPC130) e <i>Colletotrichum</i> sp. (LPPC388)	32
4.2 Identificação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de <i>Bacillus</i> sp. (LPPC265) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	34
5 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Fusarium* ocupam o terceiro lugar dentre os patógenos com maior número de espécies capazes de infectar plantas, animais domésticos e humanos devido à produção de toxinas e metabólitos secundários nocivos (MELO, 2014). *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) destaca-se dentre as principais espécies do gênero por ser o agente causal do “Mal do Panamá”. Essa doença foi responsável pela devastação de dezenas de milhares de hectares de bananas da cultivar Gros Michel entre 1940 e 1960, acarretando um prejuízo econômico em torno de 2 bilhões de dólares. Os plantios de diferentes cultivares de banana no Brasil são sujeitos à doença, impactando na produção agrícola no território nacional (CORDEIRO; DE MATOS; HADDAD, 2016).

Figura 1 – Sintomas internos (A) e externos (B) do “Mal do Panamá” em bananeira



Fonte: Christiana Bruce, 2019.

Além do gênero *Fusarium*, as espécies de fungos do gênero *Colletotrichum* também merecem destaque, ocupando a oitava posição mundial entre os patógenos mais devastadores de plantações, por serem agentes causais da “antracnose”. Essa doença, na fase da pós-colheita, afeta a qualidade de frutos como morango, banana, manga, dentre outros produtos, em regiões tropicais e subtropicais. As perdas econômicas devido a essa enfermidade podem chegar até 80% no setor de exportação (JOSHI, 2018).

Figura 2 – Sintomas da “antracnose” em frutos de banana e mamão, respectivamente



Fonte: Christiana Bruce, 2019.

O uso de fungicidas para o manejo de doenças ocasionadas por patógenos na agricultura é uma prática fundamental para garantir a segurança alimentar mundial. Entretanto, essa medida de controle gera impactos negativos ao meio ambiente, à saúde humana e animal. Além do mais, a contaminação excessiva do solo pelos defensivos agrícolas acarreta no desequilíbrio da microbiota, fazendo com que microrganismos fitopatogênicos desenvolvam mecanismos de resistência a esses compostos (BACMAGA; WYSZKOWSKA; KUCHARSKI, 2019; ROILIDES; IOSIFIDIS, 2019; ZUBROD *et al.*, 2019).

Portanto, devido ao uso indiscriminado dos defensivos agrícolas, bem como, o aumento populacional demandando o cultivo cada vez mais intensivo de produtos alimentícios, atualmente há um clamor científico e ambiental pelo desenvolvimento de práticas sustentáveis que garantam a segurança alimentar global. Dentro desse contexto, o biocontrole de doenças surge como uma alternativa sustentável, segura e eficiente no manejo integrado das enfermidades nas plantações. Os microrganismos do solo são empregados diretamente como agentes de controle de patógenos, além de estimular o crescimento de plantas e melhorar o uso de nutrientes no solo (BERG *et al.*, 2017; SYED AB RAHMAN *et al.*, 2018).

No Brasil, o controle biológico de patógenos possui uma história recente, entretanto, já existem vários registros de ativos biológicos disponíveis para o uso nas plantações. Por exemplo, o fungo *Metarhizium anisopliae* é empregado como bioinseticida no controle das pragas *Mahanarva fimbriolata*, *Zulia entreiriana* e *Deois flavopicta*, o vírus *Baculovirus spodoptera* é usado no combate da *Spodoptera frugiperda*, o inseto *Cotesia flavipes* é utilizado no controle de *Diatraea saccharalis*, o fungo *Trichoderma asperellum* atua como biofungicida do *Rhizoctonia solani*, além de várias espécies de bactérias do gênero

Bacillus que são empregadas como bioinseticidas, biofungicidas e bionematicidas de diversos patógenos agrícolas (ABC BIO, 2019).

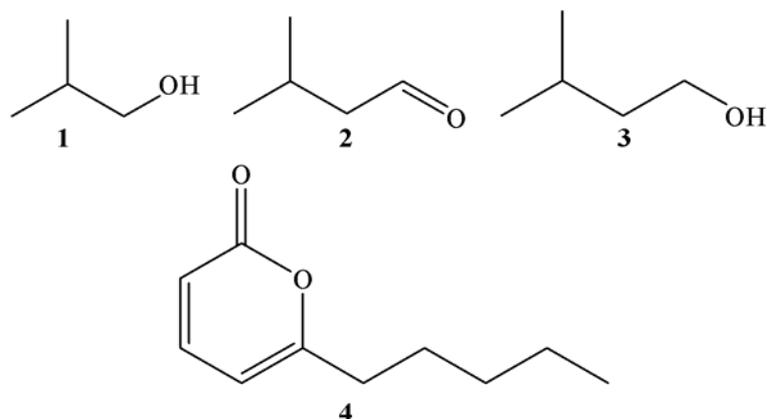
Os microrganismos habitantes da rizosfera, região mais próxima às raízes das plantas, são importantes agentes de biocontrole devido à sua ação na primeira linha de defesa contra patógenos. Por meio dessa interação, a planta fornece nutrientes para a manutenção do metabolismo dos microrganismos, enquanto é protegida pela microbiota através da secreção de metabólitos não-voláteis e voláteis. Devido a isso, os estudos de microrganismos responsáveis por desempenhar atividade de inibição contra patógenos fúngicos, através da investigação do perfil químico de substâncias envolvidas nesse processo, é uma linha de investigação que se mostra importante no mundo moderno (MENDES *et al.*, 2011; CARRIÓN *et al.*, 2019).

Os principais mecanismos de controle biológico pela ação dos microrganismos estão relacionados à ação enzimática, à produção de substâncias antimicrobianas, à indução de resistência da planta e à competição por nutrientes. Dentre os metabólitos secundários produzidos pelos agentes de biocontrole, os compostos orgânicos voláteis (COVs) têm sido reportados como importantes inibidores de patógenos, fazendo parte do arsenal de compostos responsáveis pelo controle de infecções por patógenos, e despontando como uma alternativa ambientalmente viável e segura em relação aos defensivos agrícolas (DI FRANCESCO; MARTINI; MARI, 2016).

Os COVs são metabólitos lipofílicos de baixo peso molecular (<400 Da) e apresentam alta pressão de vapor em condições ambientais. Essas propriedades lhes permitem a ampla dispersão na atmosfera e no solo, desempenhando um papel fundamental na interação entre organismos a longas distâncias (SCHMIDT *et al.*, 2016).

Os microrganismos produtores de COVs têm sido bastante relatados na literatura como protagonistas na dinâmica da microbiota. Os COVs emitidos por fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos por possuírem atividades antifúngicas e antibacterianas, sendo utilizados na agricultura como agentes de biocontrole (antagonistas). Os compostos álcool isobutílico (1), 3-metil-butanal (2) e álcool isopentílico (3) são relatados como metabólitos de inibição produzidos por *T. viride* contra patógenos da madeira, assim como o 6-pentil-2-pirona (4) emitido por *T. asperellum*, que demonstrou efeito na redução da doença causada por *Alternaria brassicicola* e *Botrytis cinerea* em *Arabidopsis thaliana* (SALWAN; RIALCH; SHARMA, 2019).

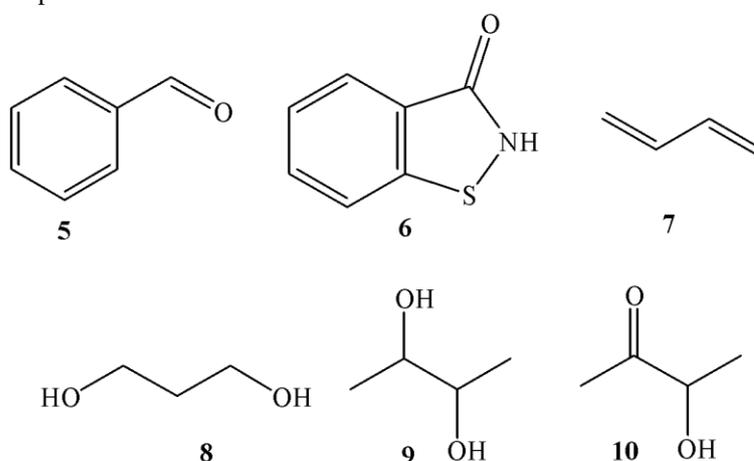
Figura 3 – Compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Trichoderma viride* e *Trichoderma asperellum* relacionados com atividade antimicrobiana



Fonte: Adaptado de SALWAN; RIALCH; SHARMA, 2019.

As bactérias do gênero *Bacillus* também são descritas como agentes de biocontrole de patógenos, através da produção de COVs com atividades antifúngicas e antimicrobianas, além de atuarem na indução do crescimento de plantas (SAXENA *et al.*, 2019). O benzaldeído (5), benzisotiazolinona (6) e 1,3-butadieno (7), produzidos pelas cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* e *B. artrophaeus*, demonstraram ação antimicrobiana contra *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha do tabaco (TAHIR *et al.*, 2017). Além disso, o 1,3-propanodiol (8), 2,3-butanodiol (9) e acetoína (10) foram emitidos pelas cepas de *B. subtilis* e *B. mojavensis*, e são considerados agentes promotores do crescimento de plantas (TAHIR *et al.*, 2017; RATH; MITCHELL; GOLD, 2018).

Figura 4 – Compostos orgânicos voláteis (COVs) de espécies de *Bacillus* com atividade antimicrobiana e promotora do crescimento de plantas



Fonte: Adaptado de TAHIR *et al.*, 2017; RATH; MITCHELL; GOLD, 2018.

Dentro desse contexto, o objetivo do trabalho consistiu na identificação e avaliação do potencial antifúngico dos COVs produzidos por uma cepa de *Bacillus* sp., isolada da rizosfera de bananeiras da cultivar “Pacovan”, frente aos patógenos fúngicos *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (FOC), agente causal do “Mal do Panamá” da bananeira e *Colletotrichum* sp., patógeno responsável pela “antracnose” em frutos de banana, na fase pós-colheita.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações gerais sobre o gênero *Bacillus*

As espécies do gênero *Bacillus* pertencem ao reino *Bacteria*, ao filo *Firmicutes*, à classe *Bacilli*, à ordem *Bacillales* e à família *Bacillaceae*. Atualmente, 377 espécies bacterianas são relatadas dentro desse gênero. Essas bactérias possuem a forma de bastonetes e são descritas como Gram-positivas e formadoras de endósporos, estruturas celulares reprodutoras resistentes às condições ambientais adversas que propiciam a sobrevivência desses microrganismos por um longo período. Devido à produção de endósporos, além da síntese enzimática e da capacidade de secreção de compostos antimicrobianos, os *Bacillus* podem colonizar diversos ambientes, como o solo, a água e intestinos de animais. Além disso, possuem importantes aplicações nutricionais, farmacológicas, agrônômicas e biotecnológicas (MAUGHAN; VAN DER AUWERA, 2011; CAULIER *et al.*, 2019).

Os peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias têm sido destaque na indústria farmacêutica devido ao aumento do número de patógenos resistentes aos medicamentos usualmente comercializados. Adicionalmente, despontam como uma alternativa eficaz de antibióticos ao atuarem na membrana celular dos microrganismos patogênicos, dificultando o desenvolvimento de mecanismos de resistência. Dentro desse contexto, as bactérias do gênero *Bacillus* são relatadas como promissoras espécies produtoras de peptídeos antimicrobianos frente a diversos patógenos. Por exemplo, a subtilosina, peptídeo antibiótico sintetizado por *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, apresenta atividade antimicrobiana contra os patógenos humanos *Gardnerella vaginalis* e *Listeria monocytogenes* (SUMI *et al.*, 2015).

As cepas de *Bacillus* sp. também têm sido descritas como protagonistas na regulação do sistema gastrointestinal de seres vivos ao serem usadas na formulação de probióticos. Esses produtos são suplementos alimentares à base de microrganismos que propiciam benefícios à saúde de seres humanos e animais. Os principais mecanismos de ação dos probióticos compostos por espécies de *Bacillus* estão relacionados à estimulação do sistema imunológico, modificação da microbiota intestinal, síntese de vitaminas, peptídeos e enzimas extracelulares. Dentre os suplementos probióticos à base de *Bacillus* sp. disponíveis comercialmente, pode-se citar o Biosporin[®], composto por *B. subtilis* e *B. licheniformis*, o Enterogermina[®], constituído de *B. clausii*, e o Anaban[™], à base de *B. subtilis* (ELSHAGHABEE *et al.*, 2017).

As proteases são enzimas responsáveis pela quebra das ligações peptídicas de proteínas e possuem amplo espectro de aplicação em diversos processos industriais. As bactérias do gênero *Bacillus* destacam-se dentre os microrganismos produtores dessas enzimas proteolíticas devido à quantidade sintetizada, chegando a mais de 20 g.L⁻¹ em algumas espécies. Além disso, essas proteínas apresentam estabilidade às condições ambientais adversas, como temperatura e pH, compostos oxidantes e solventes orgânicos. As proteases sintetizadas por espécies do gênero *Bacillus* são principalmente empregadas nos setores farmacêutico, têxtil, alimentício e na indústria de detergentes (CONTESINI; DE MELO; SATO, 2018).

As bactérias do gênero *Bacillus* também desempenham um importante papel na produtividade de cultivares agrícolas ao atuar no manejo às epidemias nas plantações por patógenos e na promoção do crescimento de plantas em condições ambientais adversas. Por exemplo, cepas de *B. pumilus* e *B. megaterium* foram responsáveis pela solubilização de fósforo (P) e fixação de nitrogênio (N) no solo mediante ação enzimática e genética, aumentando a biodisponibilidade desses compostos na rizosfera para o transporte através dos tecidos vasculares da planta. Em solos contaminados com metais tóxicos, a associação entre plantas e espécies de *Bacillus* elevou a concentração de nutrientes, antioxidantes, pigmentos e hormônios vegetais, diminuindo a acumulação dos íons metálicos. Enquanto que, os metabólitos tóxicos e as enzimas produzidas por bactérias desse gênero estão envolvidos na inibição de insetos, bactérias, fungos, dentre outras pragas que afetam as colheitas (RADGAKRISHNAN; HASHEM; ABDALLAH, 2017).

2.2 Levantamento bibliográfico dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por espécies de *Bacillus* com potencial biotecnológico

A partir de um levantamento bibliográfico utilizando a plataforma *SciFinder*, com as palavras-chave “*Bacillus volatile organic compounds*”, foi possível encontrar 157 publicações relacionadas a esse tema. Embora observado que o potencial biotecnológico dos COVs de *Bacillus* são limitados a testes em laboratório, devido à difícil produção em escala comercial, bem como, à dificuldade de isolamento, a maioria dos trabalhos relaciona o potencial biológico do microrganismo ao sinergismo da mistura de COVs emitida. Portanto, nesse levantamento foram selecionados apenas os artigos relacionados à atividade biológica de compostos isolados (TABELA 1).

Tabela 1 – Compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por espécies de *Bacillus* com potencial biotecnológico e atividade biológica para diferentes patógenos

N	COMPOSTO	ESPÉCIE DE <i>Bacillus</i>	ATIVIDADE	REFERÊNCIA
1	Benzaldeído	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> (FOC)	TAHIR <i>et al.</i> , 2017
2	Benzisotiazolinona	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Inibição do crescimento micelial de FOC	TAHIR <i>et al.</i> , 2017
3	1,3-Butadieno	<i>B. amyloliquefaciens</i> ; <i>B. subtilis</i>	Inibição do crescimento micelial de FOC	TAHIR <i>et al.</i> , 2017
4	Benzotiazol fenol	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Inibição do crescimento micelial de FOC	YUAN <i>et al.</i> , 2012
5	2,3,6-Trimetil fenol	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Inibição do crescimento micelial de FOC	YUAN <i>et al.</i> , 2012
6	2-Nonanona	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Inibição do crescimento micelial de FOC e <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	YUAN <i>et al.</i> , 2012; ECKERT, CARTER, PERRAULT, 2018
7	2-Decanona	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Inibição do crescimento micelial de FOC	YUAN <i>et al.</i> , 2012
8	Dissulfeto de carbono	<i>B. amyloliquefaciens</i> ; <i>B. subtilis</i>	Inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> e <i>Moniliophthora perniciosa</i>	CHAVES-LÓPEZ <i>et al.</i> , 2015
9	Ácido 3-metilbutanóico	<i>B. amyloliquefaciens</i> ; <i>B. cereus</i>	Inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	CHAVES-LÓPEZ <i>et al.</i> , 2015
10	2,3-Butanodiol	<i>B. amyloliquefaciens</i> ; <i>B. subtilis</i>	Promoção de crescimento de plantas; indução de resistência; regulação da expressão gênica	RYU <i>et al.</i> , 2003
11	Acetoína	<i>B. amyloliquefaciens</i> ; <i>B. subtilis</i>	Promoção de crescimento de plantas	RYU <i>et al.</i> , 2003

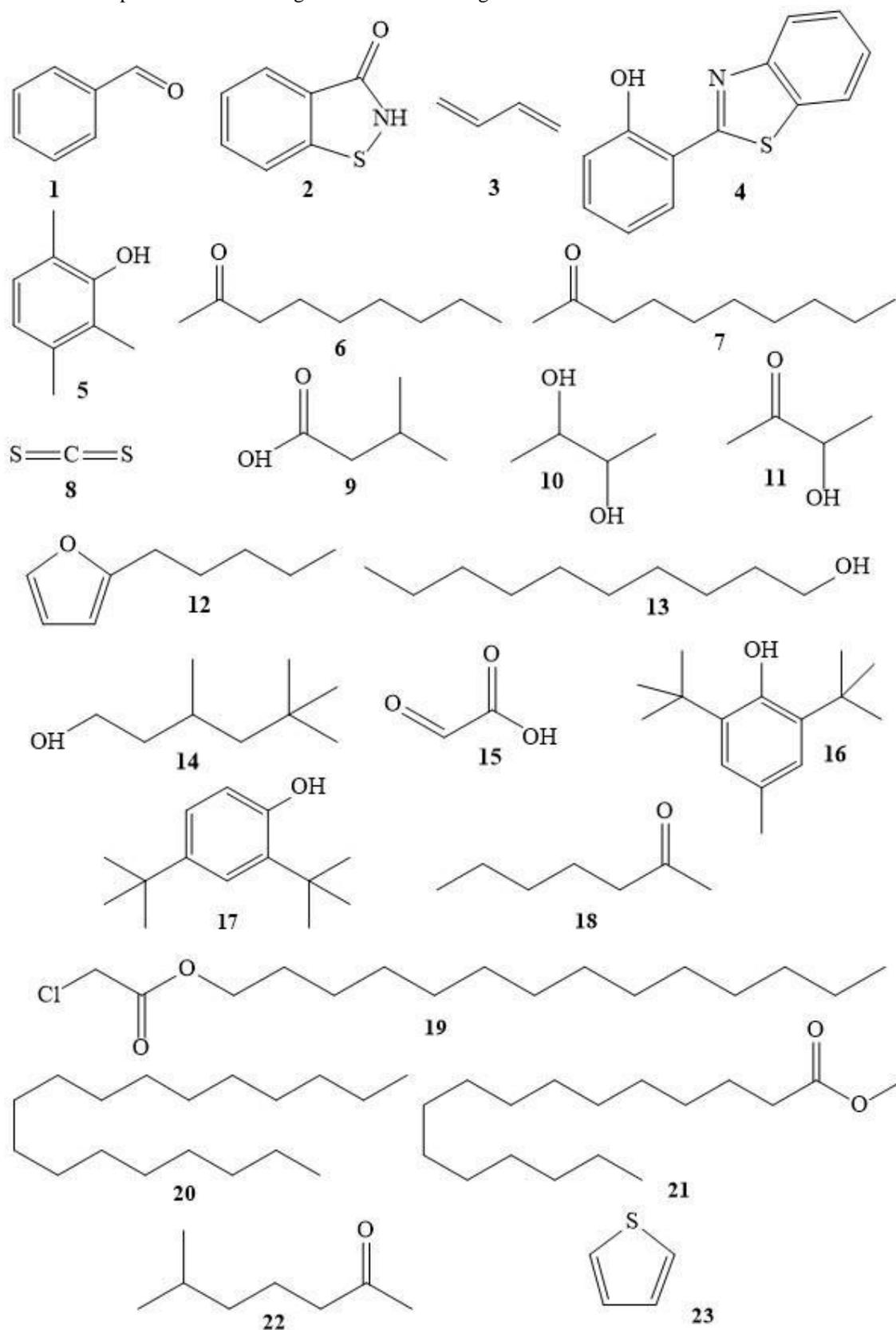
...continua

Tabela 1 – Compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por espécies de *Bacillus* com potencial biotecnológico e atividade biológica para diferentes patógenos

N	COMPOSTO	ESPÉCIE DE <i>Bacillus</i>	ATIVIDADE	REFERÊNCIA
12	2-Pentilfurano	<i>B. megaterium</i> ; <i>B. vallismortis</i> ; <i>B. altitudinis</i>	Promoção de crescimento de plantas; Inibição do crescimento micelial de <i>Monilinia fructicola</i>	ZOU; LI; YU, 2010; LIU <i>et al.</i> , 2018
13	Álcool decílico	<i>Bacillus</i> sp.	Inibição do crescimento micelial de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	XIE <i>et al.</i> , 2018
14	3,5,5-Trimetil-hexanol	<i>Bacillus</i> sp.	Inibição do crescimento micelial de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	XIE <i>et al.</i> , 2018
15	Ácido glioxílico	<i>B. subtilis</i>	Regulação da expressão gênica	KIM; LEE; RYU, 2013
16	2,6-Di- <i>tert</i> -butil-4-metilfenol	<i>B. siamensis</i>	Inibição do crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i>	ZHANG <i>et al.</i> , 2020
17	2,4-Di- <i>tert</i> -butilfenol	<i>B. siamensis</i>	Inibição do crescimento micelial de <i>B. cinerea</i> e <i>R. stolonifer</i>	ZHANG <i>et al.</i> , 2020
18	2-Heptanona	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	ECKERT; CARTER; PERRAULT, 2018
19	Tetra decilato de cloroacético	<i>B. atrophaeus</i>	Inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	RAJAOFERA <i>et al.</i> , 2019
20	Octadecano	<i>B. atrophaeus</i>	Inibição do crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i>	RAJAOFERA <i>et al.</i> , 2019
21	Hexadecanoato de metila	<i>B. atrophaeus</i>	Inibição do crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i>	RAJAOFERA <i>et al.</i> , 2019
22	6-Metil-2-heptanona	<i>B. vallismortis</i> ; <i>B. altitudinis</i>	Inibição do crescimento micelial de <i>M. fructicola</i>	LIU <i>et al.</i> , 2018
23	Tiofeno	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Inibição do crescimento micelial de <i>M. laxa</i> , <i>M. fructicola</i> e <i>B. cinerea</i>	GOTOR-VILA <i>et al.</i> , 2017

Fonte: Autor (2019).

Figura 5 – Estruturas químicas dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por espécies de *Bacillus* com potencial biotecnológico e atividade biológica



Fonte: Adaptado de RYU *et al.*, 2003; ZOU; LI; YU, 2010; YUAN *et al.*, 2012; KIM; LEE; RYU, 2013; CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2015; GOTOR-VILA *et al.*, 2017; TAHIR *et al.*, 2017; ECKERT, CARTER, PERRAULT, 2018; LIU *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2018; RAJAOFERA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020.

A maioria dos artigos encontrados referem-se às propriedades biológicas dos COVs emitidos por *B. amyloliquefaciens*. Nesses trabalhos, a inibição do crescimento micelial de fitopatógenos pelos compostos orgânicos voláteis é a atividade principal. Por exemplo, o benzaldeído (1), benzisotiazolinona (2), 1,3-butadieno (3), benzotiazol fenol (4), 2,3,6-trimetil fenol (5), 2-nonanona (6) e 2-decanona (7) foram relatados como substâncias eficientes na inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC). Em especial, o benzaldeído (1), a benzisotiazolinona (2) e o 1,3-butadieno (3) inibiram completamente o crescimento do fungo quando testados nas concentrações de 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (YUAN *et al.*, 2012; TAHIR *et al.*, 2017).

Adicionalmente, o 2,3-butanodiol (10), a acetoína (11) e o 2-pentilfurano (12), identificados a partir de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. megaterium*, apresentaram atividade de promoção de crescimento de plantas (RYU *et al.*, 2003; ZOU; LI; YU, 2010). Além disso, os COVs de *Bacillus* podem atuar também na regulação da expressão gênica de fitopatógenos, impedindo a ativação do gene responsável pela patogenicidade (RYU *et al.*, 2003; KIM; LEE; RYU, 2013). Dessa forma, esses relatos demonstram a grande relevância da caracterização estrutural e utilização dos COVs de *Bacillus*, do ponto de vista químico e biotecnológico.

2.3 Aspectos teóricos da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A cromatografia gasosa (CG) é um método físico-químico de separação de compostos voláteis termicamente estáveis baseado na distribuição das substâncias entre uma fase estacionária e uma fase móvel. A fase móvel é constituída por um gás inerte, geralmente hélio (He), hidrogênio (H₂) ou nitrogênio (N₂), responsável pelo transporte dos analitos através da fase estacionária contida na coluna cromatográfica até o detector do equipamento. As vantagens dessa técnica cromatográfica consistem no alto poder de resolução que possibilita a análise de várias substâncias em uma amostra heterogênea e dos baixos limites de detecção que podem ser alcançados. Entretanto, a principal desvantagem está na necessidade do acoplamento de técnicas auxiliares para uma identificação conclusiva dos compostos presentes na amostra (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Geralmente, acopla-se ao cromatógrafo gasoso um espectrômetro de massas para identificar os compostos voláteis analisados. A técnica de espectrometria de massas (EM) consiste na ionização dos compostos termicamente estáveis, gerando íons que são separados

em função da razão massa/carga (m/z), os quais podem ser identificados em função da m/z dos fragmentos gerados (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2015). Dessa forma, a técnica hifenada de CG-EM alia o poder de separação da cromatografia gasosa com a elevada capacidade de identificação e quantificação de compostos voláteis proporcionada pela espectrometria de massas (LANÇAS, 2019).

2.4 Extração dos compostos voláteis por microextração em fase sólida

O preparo da amostra e a extração dos compostos orgânicos voláteis (COVs) são etapas determinantes nas análises por cromatografia gasosa, pois consistem em operações técnicas com os objetivos de condicionar a matriz amostral para a análise instrumental e remover possíveis interferentes. A microextração em fase sólida, do inglês *solid-phase microextraction (SPME)*, se destaca dentre as principais técnicas atuais de condicionamento e extração de amostras voláteis devido à compatibilidade de concentração dos analitos com a sensibilidade do detector do equipamento, a comodidade da extração e a subsequente injeção dos compostos voláteis no cromatógrafo gasoso. Além disso, outro ponto positivo da técnica está na ausência do uso de solventes nocivos à saúde (CANUTO; GARRUTI; MAGALHÃES, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

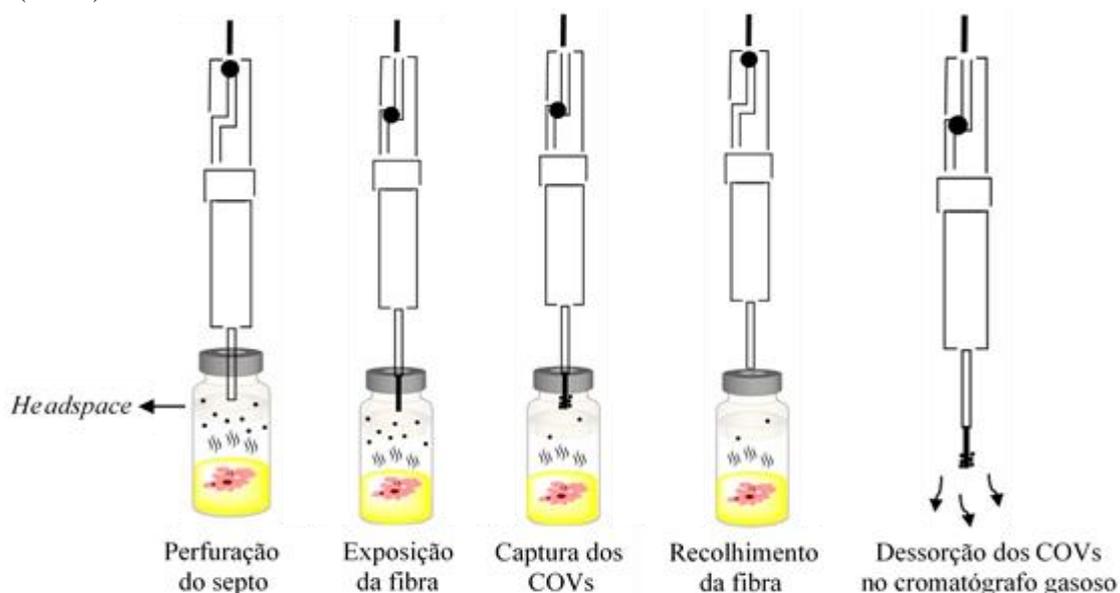
A SPME consiste no uso de uma fibra recoberta por sílica fundida e um filme polimérico, geralmente formado por polidimetilsiloxano (PDMS), *carbowax* (Cwx) ou poliacrilato (PA), ou por um sólido com propriedades adsorventes, como é o caso do carvão ativo particulado em escala micrométrica (Carboxen), dentre outros. Os revestimentos diferem quanto à faixa de captação de compostos voláteis com diferentes massas molares, temperatura de exposição e técnicas recomendadas (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

A técnica se baseia na inserção direta da fibra em *vials* contendo a amostra, estabelecendo um equilíbrio termodinâmico e cinético entre a fase estacionária da fibra e os analitos voláteis, chamado de *headspace*. Após um período de extração (que pode variar de acordo com o método empregado nas análises), os compostos com polaridade compatível àquela da fase estacionária da fibra ficam sorvidos e são posteriormente dessorvidos no injetor do equipamento (NASCIMENTO *et al.*, 2018).

A etapa determinante para uma extração satisfatória por SPME é a escolha de uma fibra com invólucro polimérico compatível à matriz amostral. Além disso, parâmetros como temperatura e tempo de extração também são fundamentais. A elevação da temperatura propicia o aumento da cinética de vaporização das substâncias e favorece a interação entre os analitos e

a fibra. Enquanto que, o tempo de extração é proporcional ao revestimento da fibra, pois, dependendo da natureza do invólucro polimérico, quanto maior a espessura, maior a captação de compostos voláteis e o período de exposição à matriz amostral (VALENTE; AUGUSTO, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Figura 6 – Etapas envolvidas na microextração em fase sólida dos compostos orgânicos voláteis (COVs)



Fonte: Autor (2019).

2.5 Índice de Kovats (KI)

A identificação de compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) é viabilizada pelo uso de bibliotecas de espectros de massas e através da comparação dos tempos de retenção dos componentes com um padrão analítico. Entretanto, somente esses dois parâmetros não são eficazes, devido à insuficiência dos bancos de dados em abranger diversos compostos, além da dependência dos tempos de retenção com a fase estacionária e com as condições de análise. Portanto, para assegurar a identificação das substâncias voláteis, faz-se uso do índice de Kovats, uma ferramenta que relaciona os tempos de retenção do composto de interesse e dos padrões de n-alcenos (NASCIMENTO *et al.*, 2018), que pode ser obtido através da Equação 1.

Equação 1 – Expressão para o cálculo do índice de Kovats (KI) utilizado na determinação estrutural de compostos orgânicos voláteis (COVs) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

$$KI = \frac{100 \cdot [n + (N + n) \cdot \log TR_{(x)} - \log TR_{(n)}]}{[\log TR_{(N)} - \log TR_{(n)}]} \quad (1)$$

n: número de carbonos do alcano anterior;

N: número de carbonos do alcano posterior;

TR_(x): tempo de retenção do composto;

TR_(n): tempo de retenção do alcano anterior;

TR_(N): tempo de retenção do alcano posterior.

Fonte: ADAMS, 2007.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A manipulação dos microrganismos foi realizada no Laboratório de Patologia Pós-colheita, da Embrapa Agroindústria Tropical-CE (CNPAT), localizada em Fortaleza-CE. Os microrganismos foram manipulados em capela de fluxo laminar PACHANE® PA 310 ECO, cuja assepsia foi realizada com álcool 70% e luz ultravioleta por 15 minutos. Os materiais utilizados foram previamente esterilizados em autoclave vertical PHOENIX® à temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão durante 15 minutos.

3.1 Origem, preservação e cultivo dos microrganismos

3.1.1 Isolado bacteriano de *Bacillus* sp. (LPPC265)

A cepa de *Bacillus* sp. (FIGURA 7, a), isolada a partir da rizosfera de bananeiras da cultivar “Pacovan”, foi coletada no município de Redenção-CE pela Dra. Christiana Bruce, da Embrapa Agroindústria Tropical. A cepa da bactéria, denominada de LPPC265, encontra-se depositada na Coleção de Microrganismos de Interesse para Agroindústria Tropical (CMIAT) do Laboratório de Patologia Pós-colheita e preservada em meio de cultura caldo nutriente (TABELA 2), suplementado com glicerol 30% e mantida sob ultracongelamento à temperatura de -80 °C.

Para os experimentos de antagonismo, a cepa bacteriana preservada foi ativada em caldo nutriente por 24 horas e, posteriormente, incubada à temperatura de 28 ± 2 °C, fotoperíodo alternado (claro/escuro) de 12 horas, durante um período de 24 horas, em placas de Petri contendo o meio de cultura 523 (TABELA 2). Segundo Kado e Heskett (1970), o meio de cultivo 523 é empregado tanto para o cultivo de bactérias Gram-positivas, como aquelas do gênero *Bacillus*, bem como para Gram-negativas, permitindo um crescimento rápido das colônias.

3.1.2 Isolados fúngicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (LPPC130) e *Colletotrichum* sp. (LPPC388)

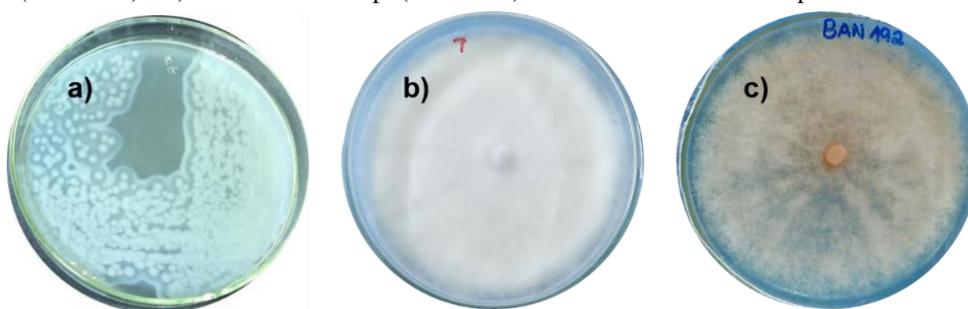
O patógeno fúngico *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (LPPC130) (FIGURA 7, b) foi isolado a partir de bananeiras sintomáticas da cultivar “Maçã”. O isolado foi cedido pelo pesquisador Dr. Daniel Schurt da Embrapa Roraima, localizada na cidade de Boa Vista-RR. O

fungo *Colletotrichum* sp. (LPPC388) (FIGURA 7, c) foi isolado a partir de frutos sintomáticos de bananas Prata, em Fortaleza-CE. Os dois patógenos foram preservados pelo método Castellani (CASTELLANI, 1963).

Os patógenos foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) (TABELA 2) e incubados à temperatura de 28 ± 2 °C com fotoperíodo alternado (claro/escuro) de 12 horas, durante 7 dias. Após o período de incubação, foram feitos discos miceliais de 5 mm de diâmetro para as culturas de LPPC130 e LPPC388, os quais foram depositados em frascos de penicilina contendo cerca de 5 mL de água destilada estéril. Os frascos foram devidamente tampados e envoltos com parafilme, a fim de impedir a contaminação dos isolados, e armazenados na Coleção de Microrganismos de Interesse para Agroindústria Tropical (CMIAT), do Laboratório de Patologia Pós-colheita.

Para a realização dos experimentos, as culturas fúngicas preservadas foram então ativadas e cultivadas em placas de Petri, contendo o meio de cultura 523 (TABELA 2). A escolha desse meio nutricional para o cultivo dos fungos foi viabilizada a partir de estudos preliminares realizados no Laboratório de Patologia Pós-colheita, onde observou-se que os patógenos fúngicos se desenvolvem satisfatoriamente nesse meio de cultura. As placas de Petri foram incubadas à temperatura de 28 ± 2 °C e fotoperíodo alternado (claro/escuro) de 12 horas, durante um período de 6 dias para o fungo LPPC130, e um período de 4 dias para o patógeno LPPC388.

Figura 7 – Cepas de: a) *Bacillus* sp. (LPPC265); b) *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (LPPC130) e c) *Colletotrichum* sp. (LPPC388) utilizadas em todos os experimentos



Fonte: Autor (2019).

Tabela 2 - Composição dos meios de cultura BDA, 523 e caldo nutriente utilizados em todos os ensaios

MEIO DE CULTURA	COMPOSIÇÃO
BDA	39 g/L (Extrato de batata 200 g/L; ágar 15 g/L; dextrose 20 g/L).
523	Sacarose 10 g/L; caseína hidrolisada 8 g/L; extrato de levedura 4 g/L; K ₂ HPO ₄ 2g/L; MgSO ₄ .7H ₂ O 0,3 g/L; ágar bacteriológico 15 g/L.
CALDO NUTRIENTE	Extrato de carne 1 g/L; extrato de levedura 2 g/L; peptona 5 g/L; NaCl 5 g/L

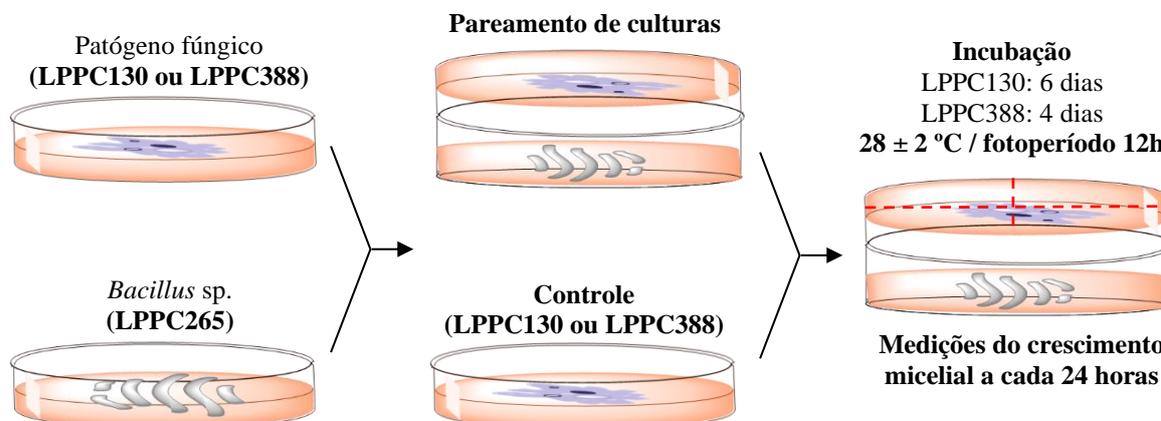
Fonte: Adaptado de CASTELLANI, 1963; KADO; HESKETT, 1970; Difco™, 2019.

3.2 Influência dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Bacillus* sp. (LPPC265) no crescimento micelial dos patógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (LPPC130) e *Colletotrichum* sp. (LPPC388)

O experimento de antagonismo foi conduzido a partir da adaptação do método de pareamento de placas, descrito por GOTOR-VILA *et al.* (2017). Para tal, as bases de placas de Petri de mesmo diâmetro foram encaixadas, de forma que o antagonista e o patógeno não possuíam contato direto (FIGURA 8).

Dessa forma, o isolado bacteriano LPPC265, incubado previamente por 24 horas, foi repicado para placas de Petri contendo meio de cultura 523, utilizando alça de platina. Em seguida, discos miceliais de 5 mm de diâmetro das culturas dos isolados fúngicos LPPC130 e LPPC388, incubados anteriormente por 6 e 4 dias, respectivamente, foram inoculados no centro de outras placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura. As placas de Petri de mesmo diâmetro foram encaixadas de modo que o antagonista (LPPC265) e os patógenos (LPPC130 ou LPPC388) estivessem separados a uma distância de 1,5 cm. O sistema foi vedado com parafilme para impedir a contaminação e perda de COVs, e mantido sob condições estáticas à temperatura de 28 ± 2 °C, fotoperíodo alternado (claro/escuro) de 12 horas, durante um período de 6 dias para o LPPC130, e um período de 4 dias para o LPPC388. Em adição, foram inoculados discos miceliais de 5 mm dos fungos isoladamente em placas de Petri contendo apenas o meio de cultura 523, para atuarem como controle do experimento.

Figura 8 – Teste de antagonismo dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Bacillus* sp. (LPPC265) versus *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (LPPC130) e *Colletotrichum* sp. (LPPC388) segundo o método de pareamento de placas



Fonte: Autor (2019).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 repetições, onde cada repetição equivale a um conjunto de placas encaixadas. As medições dos crescimentos miceliais dos patógenos foram realizadas utilizando um paquímetro digital DIGIMESS[®] a cada 24 horas de incubação, até o crescimento completo do controle (placa de Petri contendo apenas os patógenos fúngicos).

O percentual de inibição do crescimento micelial (ICM) foi calculado a partir da equação 2, na qual **C** indica o diâmetro do crescimento micelial do controle e **T** corresponde ao diâmetro do crescimento micelial do patógeno quando exposto aos COVs da bactéria antagonista.

Equação 2 – Expressão para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial dos fungos

$$\text{ICM (\%)} = \left(\frac{C - T}{C} \right) \times 100 \quad (2)$$

Fonte: Adaptada de GOTOR-VILA *et al.*, 2017.

3.3 Análise dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por *Bacillus* sp. (LPPC265) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

As análises dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por *Bacillus* sp. (LPPC265) foram realizadas através do uso de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas SHIMADZU-QP2010SE, pertencente ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (DQOI-UFC).

Para a realização do experimento, incubou-se a cepa bacteriana de *Bacillus* sp.

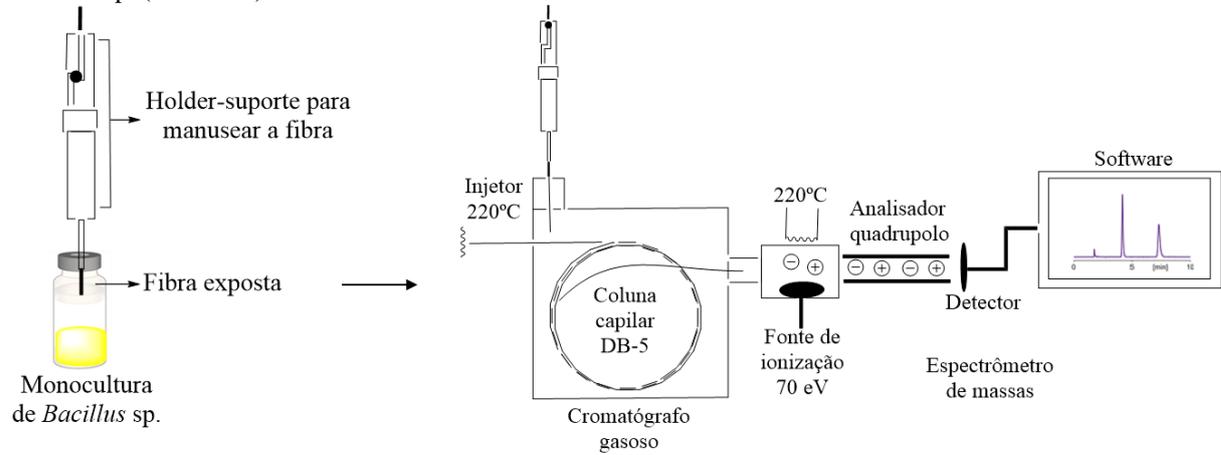
(LPPC 265) em placas de Petri contendo o meio de cultura 523, durante um período de 24 horas, à temperatura de 28 ± 2 °C e fotoperíodo alternado (claro/escuro) de 12 horas. Posteriormente, para a análise dos COVs de *Bacillus* sp. (LPPC265), preparou-se uma suspensão bacteriana de 10 mL contendo $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL) da bactéria. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 100 μ L, a qual foi transferida para *vials* de 60 mL contendo 15 mL de meio de cultivo 523. O ensaio foi conduzido em triplicata, e os frascos foram devidamente vedados e incubados à temperatura de 28 ± 2 °C durante um período de 72 horas, com fotoperíodo alternado (claro/escuro) de 12 horas.

Os parâmetros de análise por CG-EM selecionados foram baseados em estudos de COVs produzidos por espécies de *Bacillus* relatados na literatura, adaptando-se nesse trabalho a temperatura de exposição da fibra ao *headspace* para 30 °C, a fim de simular as condições ambientais do experimento de antagonismo com pareamento de placas (YUAN *et al.*, 2012; TAHIR *et al.*, 2017).

Dessa forma, a extração e coleta dos COVs de LPPC265 foram conduzidas através de microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME), mediante a exposição da fibra de 2 cm revestida por divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 50/30 μ m) nos *vials* durante 30 minutos, à temperatura de 28 ± 2 °C. Os analitos foram dessorvidos da fibra no injetor do equipamento à temperatura de 220 °C por 5 minutos, procedendo-se a análise no modo *splitless*. Os COVs foram separados utilizando-se uma coluna capilar polidimetilsiloxano (DB5, Agilent J&W) de 30m x 0,25mm x 0,25 μ m, empregando o gás de arraste hélio (He) com fluxo de 1 mL/min. O forno do equipamento foi programado a uma temperatura inicial de 33 °C durante 3 minutos, aumentando a uma taxa de 10 °C/min até 180 °C e, por fim, a 4 °C/min até 240 °C, mantendo-se por 5 minutos, decorrendo o tempo de análise de 25 minutos. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização eletrônica a 70 eV à temperatura de 220 °C e o analisador quadrupolo foi programado para um scan contínuo de substâncias de massas de 35 a 500 Da.

A identificação dos COVs foi realizada através da análise comparativa no banco de dados da biblioteca de espectros de massas do NIST/EPA/NIH, de acordo com as similaridades dos espectros de massas, os índices de Kovats, obtidos através das análises dos padrões de n-alcenos C7 a C30, e à fase da coluna empregada.

Figura 9 - Representação da metodologia empregada na análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pelo isolado de *Bacillus* sp. (LPPC265)



Fonte: Autor (2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

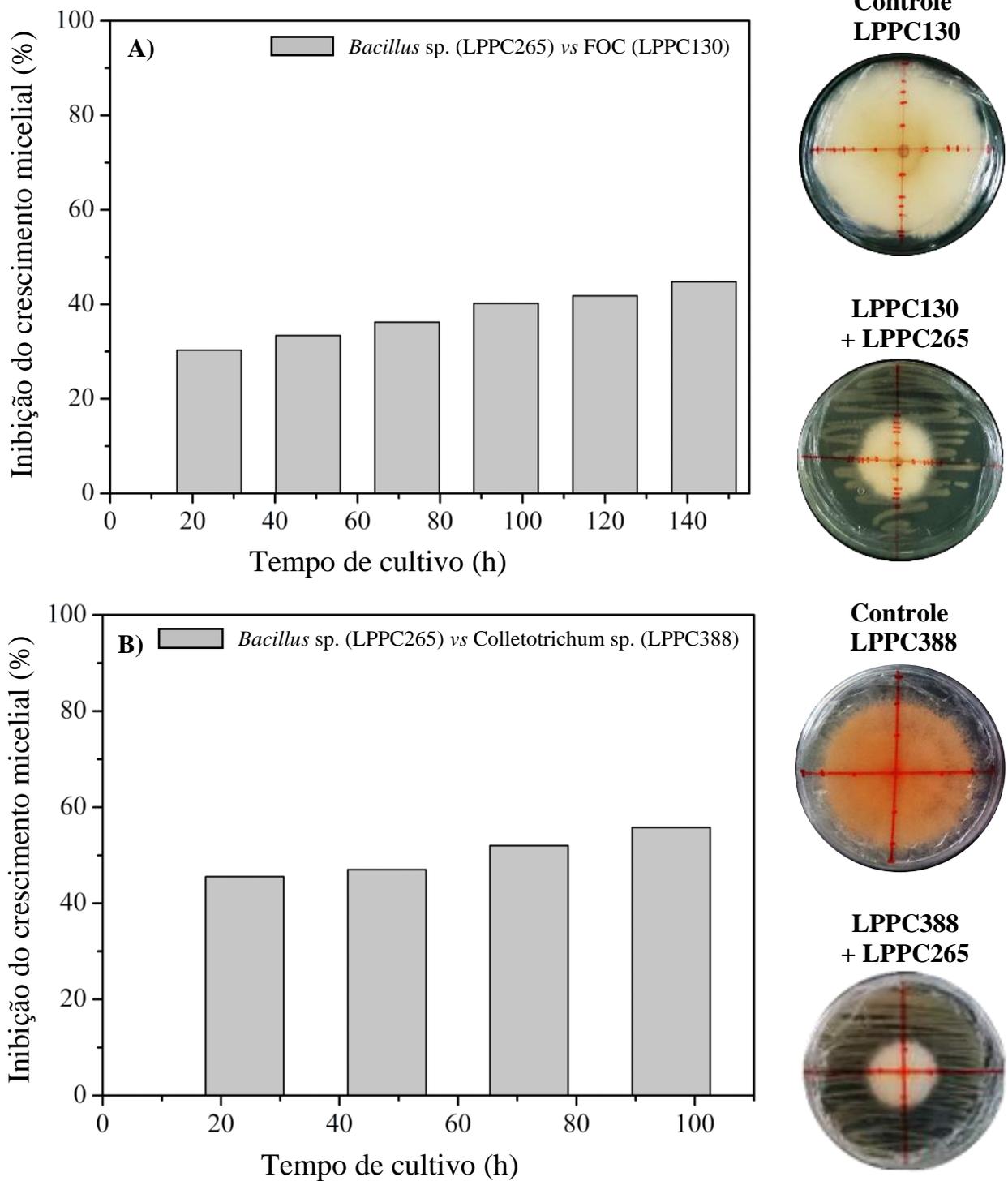
4.1 Influência dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Bacillus* sp. (LPPC265) frente aos fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (LPPC130) e *Colletotrichum* sp. (LPPC388)

A análise dos experimentos de antagonismo utilizando pareamento de placas entre o isolado de *Bacillus* sp. (LPPC265) frente aos fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (LPPC130) e *Colletotrichum* sp. (LPPC388) demonstraram que os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pela bactéria foram promissores na inibição do crescimento micelial dos fungos. Os percentuais de inibição dos patógenos LPPC130 e LPPC388, ao final de 6 e 4 dias de incubação, foram de 44,8% e 55,8%, respectivamente (FIGURA 10).

Os dados obtidos no presente experimento corroboram com diferentes estudos, nos quais utilizam espécies de *Bacillus* para o controle *in vitro* de patógenos fúngicos. Por exemplo, foi constatado em um estudo, o efeito antagonista de COVs de *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* com faixa de inibição de crescimento micelial entre 30% e 40%, após um período de incubação de 3 dias (YUAN *et al.*, 2012). Além disso, os COVs de *B. subtilis* foram capazes de inibir o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* em aproximadamente 50%, depois de 7 dias de experimento (CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2015). Em outro trabalho, constatou-se que os COVs de *B. velezensis* inibiram os patógenos *F. oxysporum* e *F. graminearum* em 57% e 68%, respectivamente, ao final de 7 dias de incubação (MYO *et al.*, 2019).

Algumas espécies de *Bacillus* também são relatadas como antagonistas de fungos do gênero *Colletotrichum*. O estudo da atividade antifúngica dos compostos orgânicos voláteis produzidos por duas cepas de *B. amyloliquefaciens* frente a *C. lindemuthianum*, resultou em percentuais de inibição de 18% e 16%, após um período de incubação de 11 dias (MARTINS *et al.*, 2019). Os COVs emitidos por *B. amyloliquefaciens* e *B. mycoides* foram responsáveis por inibir o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* na faixa de 25% a 33%, ao final de 9 dias de experimento (GUEVARA-AVENDAÑO *et al.*, 2019). Enquanto que, os COVs gerados por *B. velezensis* proporcionaram a inibição do crescimento micelial de *C. lindemuthianum* em 70,6%, após 10 dias de incubação (GAO *et al.*, 2017).

Figura 10 – Inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (LPPC130), durante 6 dias de incubação (a) e *Colletotrichum* sp. (LPPC388), ao longo de 4 dias de experimento (b) pela ação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Bacillus* sp. (LPPC265)



Fonte: Autor (2019).

Um outro aspecto importante a ser ressaltado, foi a mudança de coloração do micélio de *Colletotrichum* sp. (LPPC388), que se apresentava na cor alaranjada nas placas de Petri controle (apenas com o isolado fúngico, sem a presença da bactéria antagonista). Enquanto

que, no conjunto de placas de Petri na presença da bactéria antagonista, o micélio apresentou-se totalmente descolorido (FIGURA 10, B).

Tal fato pode ser explicado de acordo com a observação de LIN *et al.* (2012), que relataram que a produção de melanina pelos micélios de *C. orbiculare* ocorre devido à ação do gene *LAC2*. Esse gene é responsável pela codificação da enzima *lacase*, capaz de oxidar compostos fenólicos, como o 1,8-dihidroxi-naftaleno, e desempenha um papel essencial na pigmentação dos conídios e, conseqüentemente, na fitopatogenicidade do microrganismo. Desse modo, sugere-se que os COVs produzidos por *Bacillus* sp. (LPPC265) tiveram efeito na inibição do crescimento micelial, bem como interferiram em fatores envolvidos na patogenicidade de *Colletotrichum* sp. (LPPC388) devido à descoloração do micélio do patógeno fúngico na presença da bactéria.

4.2 Identificação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Bacillus* sp. (LPPC265) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A análise dos COVs de *Bacillus* sp. (LPPC265) utilizando CG-EM permitiu a identificação de 11 compostos pertencentes à classe de alcenos: 2-metil-1,3-butadieno (**1**), *trans*-2-hexeno (**2**) e 3-metileno-1-penteno (**3**); alceno: 1-cloro-hexano (**10**); álcoois: 3-metil-1-butanol (**4**) e 1-hexanol (**11**); cetona: metilisobutilcetona (**5**); éster: 2-metil-propanoato de etila (**6**) e ácidos carboxílicos: ácido butanóico (**7**), ácido 3-metil-butanóico (**8**) e ácido 2-metil-butanóico (**9**) (TABELA 3).

O ácido 3-metil-butanóico (**8**), o ácido 2-metil-butanóico (**9**) e o 1-cloro-hexano (**10**) foram os constituintes majoritários identificados, com percentuais de áreas de 19,59%, 16,23% e 24,94%, respectivamente. Os percentuais de áreas foram obtidos através da análise por cromatografia gasosa (CG) e estão diretamente relacionados às concentrações das substâncias na mistura de COVs. Os compostos ácido 3-metil-butanóico (**8**) e ácido 2-metil-butanóico (**9**) já possuem relatos de atividade antifúngica, quando inibiram o crescimento micelial de *C. lindemuthianum* em torno de 95%, em 5 dias de cultivo (MARTINS *et al.*, 2019). Em adição, o composto (**8**) também inibiu o crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* em 71,4%, após 5 dias de incubação (CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2015).

Embora os compostos 2-metil-1,3-butadieno (**1**), 3-metil-1-butanol (**4**), metilisobutilcetona (**5**) e ácido butanóico (**7**) foram identificados apenas como constituintes minoritários, com respectivos percentuais de área de 7,02%, 2,69%, 4,20% e 7,51% (TABELA

3), relatos da literatura revelam que essas substâncias são importantes no biocontrole de patógenos fúngicos.

O 2-metil-1,3-butadieno, ou isopreno, (**1**) foi produzido por *B. subtilis* em fases diferentes de crescimento, sugerindo a sua participação no mecanismo de sinalização celular, responsável pelo desenvolvimento dos esporos. Além disso, observou-se um aumento da produção desse composto quando *B. subtilis* foi submetido à condições ambientais adversas, o que sugere uma possível atuação também no mecanismo de defesa do microrganismo (MCGENITY; CROMBIE; MURRELL, 2018). O 3-metil-1-butanol (**4**) proporcionou a inibição de 100% dos patógenos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* nas concentrações acima de $1,0 \mu\text{L.mL}^{-1}$, após 3 dias de incubação (REZENDE *et al.*, 2015). Além disso, também foi responsável pela inibição do patógeno fúngico da batata-doce, *Ceratocystis fimbriata*, com percentuais de inibição de 100% nas concentrações de 20, 40 e 80 μL , durante 5 dias de cultivo (ZHANG *et al.*, 2019). A metilisobutilcetona (**5**), produzida por *Bacillus pumilus*, teve atuação direta na inibição em torno de 95% a 100% no crescimento micelial de *Penicillium italicum*, após 5 dias de experimento (MORITA *et al.*, 2019). Por outro lado, o ácido butanóico (**7**), reconhecido pela *Food and Drug Administration (FDA)*, e empregado em alimentos e medicamentos por suas propriedades antibacterianas, apresentou atividade bactericida *in vitro* frente às bactérias *Staphylococcus pseudintermedius* e *Acinetobacter baumannii*, patógenos humanos e caninos resistentes à antibióticos (KENNEDY *et al.*, 2019).

Tabela 3 – Compostos orgânicos voláteis (COVs) identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) na cultura de *Bacillus* sp. (LPPC265)

Nº	COMPOSTO	TRETEÇÃO (min)	Nº CAS	KI	KI _{LIT}	ÁREA (%)
1	2-Metil-1,3-butadieno	4,000	78 – 79 – 5	-	-	7,02
2	<i>trans</i> -2-Hexeno	6,177	592 – 43 – 8	607	604	4,38
3	3-Metileno-1-penteno	6,594	922 – 61 – 2	625	619	2,49
4	3-Metil-1-butanol	9,475	123 – 51 – 3	739	739	2,69
5	Metilisobutilcetona	9,656	108 – 10 – 1	746	740	4,20
6	2-Metil-propanoato de etila	10,120	79 – 31 – 2	765	765	2,43
7	Ácido butanóico	10,699	107 – 92 – 6	786	784	7,51
8	Ácido 3-metil-butanóico	12,067	105 – 43 – 1	846	845	19,59
9	Ácido 2-metil-butanóico	12,413	116 – 53 – 0	861	857	16,23
10	1-Cloro-hexano	12,584	544 – 10 – 5	868	857	24,94
11	1-Hexanol	12,705	111 – 27 – 3	873	872	10,55

Tretenção: tempo gasto pelo composto desde a injeção da amostra no cromatógrafo gasoso até a detecção no *software* do equipamento;

Nº CAS: registro de uma substância química no banco de dados do *Chemical Abstracts Service*;

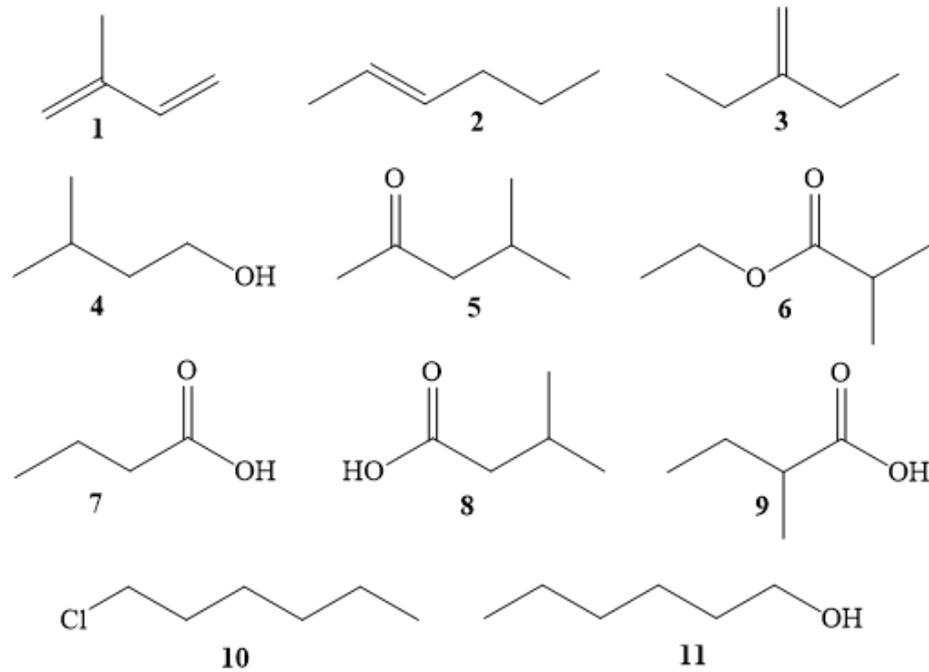
KI: índice de Kovats obtido no experimento através da equação 1;

KI_{LIT}: índice de Kovats descrito na literatura para os parâmetros de análise estabelecidos;

Área(%): percentual de área obtido por cromatografia gasosa (CG) de cada composto identificado.

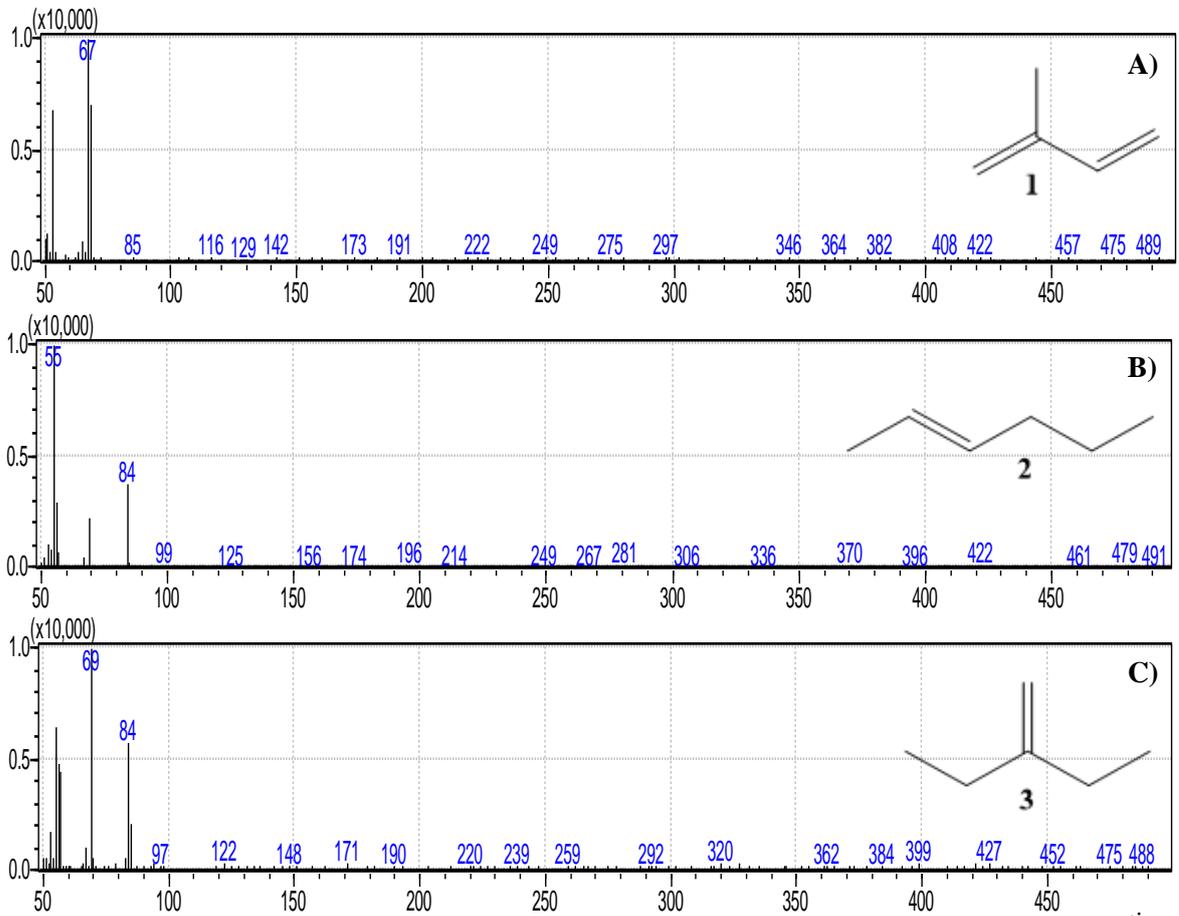
Fonte: Autor (2019).

Figura 11 - Estruturas químicas dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Bacillus* sp. (LPPC265)

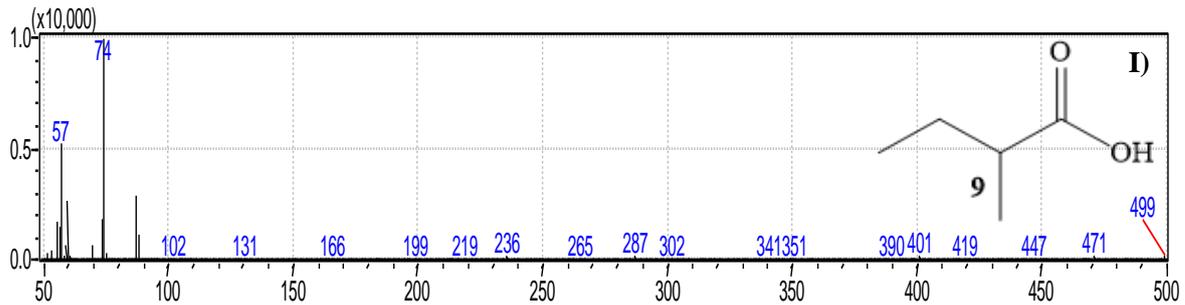
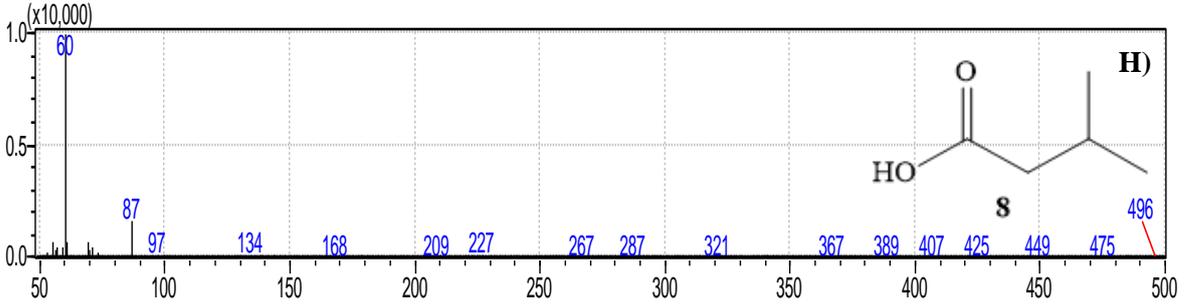
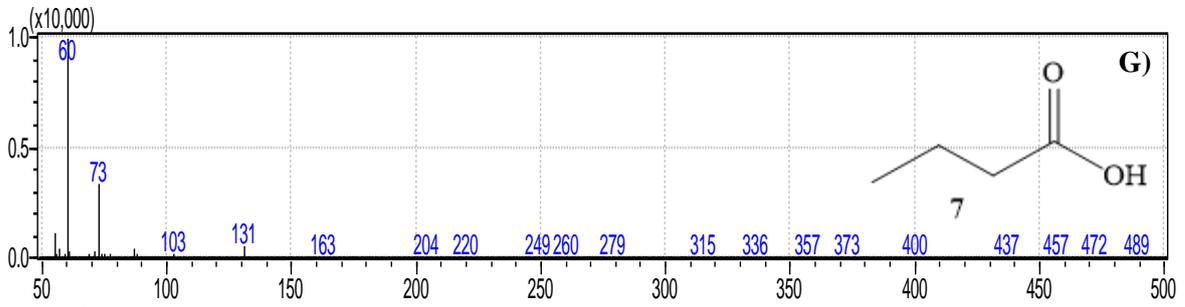
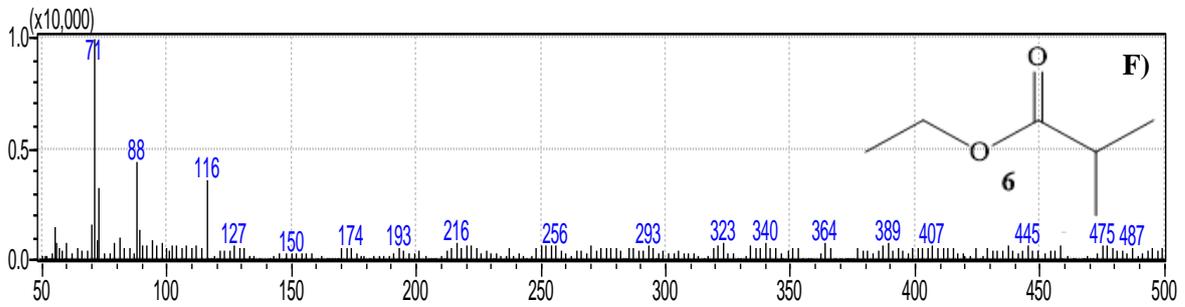
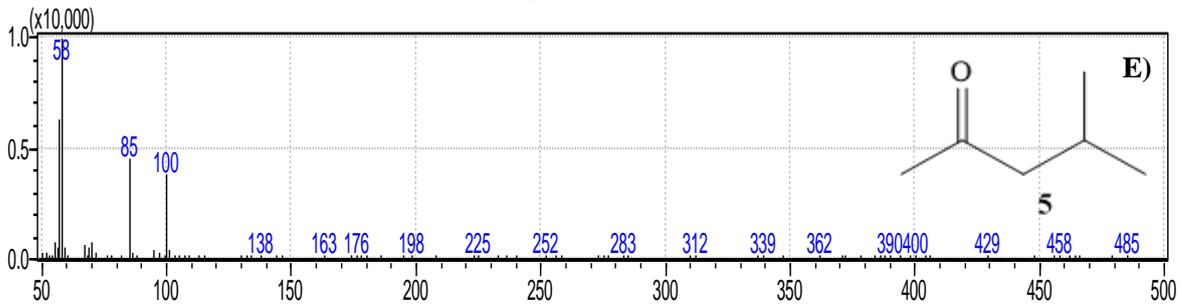
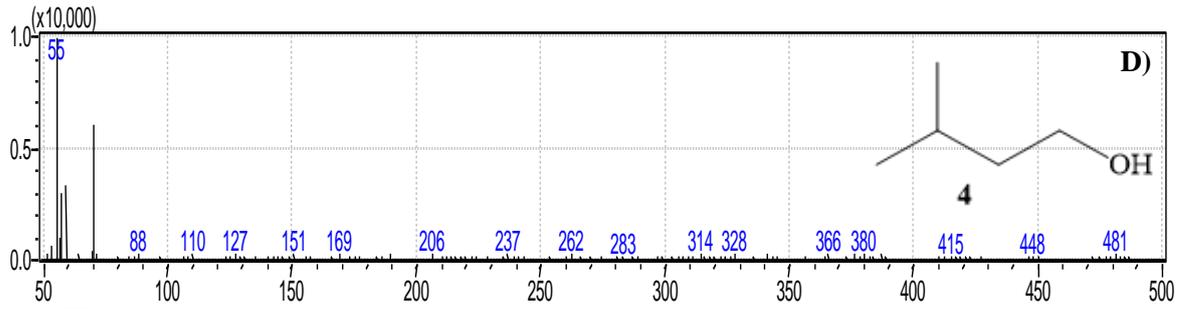


Fonte: Autor (2019).

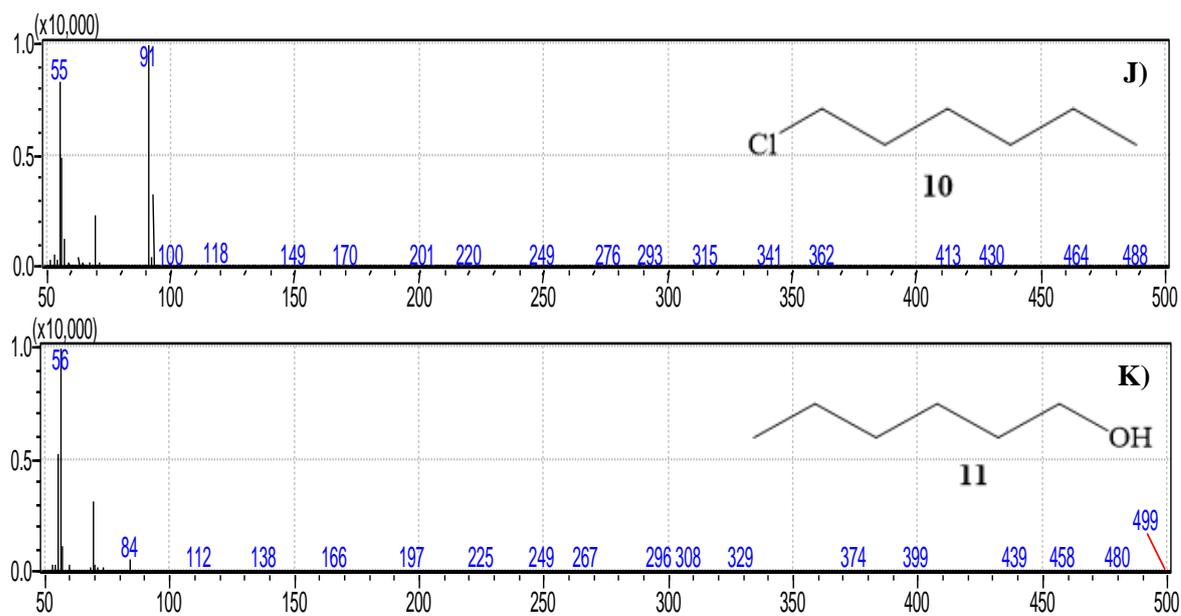
Figura 12 – Espectros de massas dos compostos: A) 2-Metil-1,3-butadieno; B) *trans*-2-Hexeno; C) 3-Metileno-1-penteno; D) 3-Metil-1-butanol; E) Metilisobutilcetona; F) 2-Metil-propanoato de etila; G) Ácido butanóico; H) Ácido 3-metil-butanóico; I) Ácido 2-metil-butanóico; J) 1-Cloro-hexano; K) 1-Hexanol



...continua



...continua



Fonte: Autor (2019).

5 CONCLUSÃO

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por *Bacillus* sp. (LPPC265) foram promissores na inibição do crescimento micelial dos patógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (LPPC130) e *Colletotrichum* sp. (LPPC388). Ao final de 6 dias de incubação, o patógeno LPPC130 foi controlado em 44,8%, enquanto que o crescimento micelial do fungo LPPC388 foi inibido em 55,8%, após 4 dias de experimento.

A análise da monocultura de *Bacillus* sp. (LPPC265) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) resultou na identificação de 11 compostos orgânicos voláteis (COVs) relacionados à inibição do crescimento micelial dos patógenos. Dentre os compostos, destacam-se o 2-metil-1,3-butadieno (**1**), o 3-metil-1-butanol (**4**), a metilisobutilcetona (**5**), o ácido butanoico (**7**), o ácido 3-metil-butanóico (**8**) e o ácido 2-metil-butanóico (**9**), por possuírem relatos na literatura como substâncias importantes no biocontrole de fitopatógenos.

Os resultados obtidos se mostraram promissores e corroboraram com os relatos do uso de *Bacillus* como efetivos agentes de biocontrole. Além disso, sugere-se o possível emprego da cepa bacteriana de *Bacillus* sp. (LPPC265) no controle *in vivo* de doenças ocasionadas por patógenos do solo, como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, bem como para patógenos incidentes na pós-colheita, como *Colletotrichum* sp. na cultura da banana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil componentes by gas chromatography/mass spectrometry**. 4 ed. Carol Stream, IL: Allured publishing Corporation, 2007.

ABC BIO: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE CONTROLE BIOLÓGICO. **Produtos biológicos de controle registrados no Brasil desde 2005**. São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.abcbio.org.br/biodefensivos-registrados/>. Acesso em: 16 dezembro 2019.

BAĆMAGA, M.; WYSZKOWSKA, J.; KUCHARSKI, J. The biochemical activity of soil contaminated with fungicides. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 54, n. 4, p. 252–262, 2019.

BERG, G.; KÖBERL, M.; RYBAKOVA, D.; MÜLLER, H.; GROSCHE, R.; SMALLA, K. Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 5, p. 1–9, 2017.

CANUTO, K. M.; GARRUTI, D. S. dos; MAGALHÃES, H. C. R. **Microextração em fase sólida: método analítico prático para extração de compostos voláteis de frutas**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. *Comunicado técnico*. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes//publicacao/900859/microextracao-em-e-solida-metodos-analiticos-praticos-para-extracao-de-compostos-volateis-de-frutas>. Acesso em: 29 de novembro de 2019.

CARRIÓN, V. J.; PEREZ-JARAMILLO, J.; CORDOVEZ, V.; TRACANNA, V.; DE HOLLANDER, M.; RUIZ-BUCK, D.; MENDES, L. W.; VAN IJCKEN, W. F. J.; GOMEZ-EXPOSITO, R.; ELSAYED S. S.; MOHANRAJU, P.; ARIFAH, A.; VAN DER OOST, J.; PAULSON, J. N.; MENDES, R.; VAN WEZEL, G. P.; MEDEMA, M. H.; RAAIJMAKERS, M. J. Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. **Science**, v. 366, n. 6465, p. 606–612, 2019.

CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 20, n. 1–2, p. 1–6, 1963.

CAULIER, S.; NANNAN, C.; GILLIS, A.; LICCIARDI, F.; BRAGARD, C.; MAHILLON, J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, p. 1–19, 2019.

CHAVES-LÓPEZ, C.; SERIO, A.; GIANOTTI, A.; SACCHETTI, G.; NDAGIJIMANA, M.; CICCARONE, C.; STELLARINI, A.; CORSETTI, A.; PAPARELLA, A. Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 2, p. 487–499, 2015.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.

CORDEIRO, Z. J. M.; DE MATOS, A. P.; HADDAD, F. Doenças fúngicas e bacterianas. *In*: FERREIRA, F. C.; DE OLIVEIRA E SILVA, S.; AMORIM, E. P.; DOS SANTOS-SEREJO, J. A. (org.). **O agronegócio da banana**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. p. 561-564.

CORTESINI, F. J.; DE MELO, R. R.; SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical reviews in biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321-334, 2018.

DI FRANCESCO, A.; MARTINI, C.; MARI, M. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? **European Journal of Plant Pathology**, v. 145, n. 4, p. 711-717, 2016.

ECKERT, K. E.; CARTER, D. O.; PERRAULT, K. A. Sampling dynamics for volatile organic compounds using headspace solid-phase microextraction arrow for microbiological samples. **Separations**, v. 5, n. 3, p. 1-15, 2018.

ELSHAGHABEE, F. M. F.; ROKANA, N.; GULHANE, R. D.; SHARMA, C.; PANWAR, H. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1490, p. 1-15, 2017.

GAO, Z.; ZHANG, B.; LIU, H.; HAN, J.; ZHANG, Y. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v. 105, p. 27-39, 2017.

GOTOR-VILA, A.; TEIXIDÓ, N.; DI FRANCESCO, A.; USALL, J.; UGOLINI, L.; TORRES, R.; MARI, M. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. **Food Microbiology**, v. 64, p. 219-225, 2017.

GUEVARA-AVENDAÑO, E.; BEJARANO-BOLÍVAR, A. A.; KIEL-MARTÍNEZ, A. L.; RAMÍREZ-VÁZQUEZ, M.; MÉNDEZ-BRAVO, A.; VON WOBESER, E. A.; SÁNCHEZ-RANGEL, D.; GUERRERO-ANALCO, J. A.; ESKALEN, A.; REVERCHON, F. Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbiological Research**, v. 219, n. October 2018, p. 74-83, 2019.

JOSHI, R. A Review on *Colletotrichum* spp. Virulence mechanism against host plant defensive factors. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 6, n. 6, p. 64-67, 2018.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-976, 1970.

KENNEDY, G. M.; MIN, M. Y.; FITZGERALD, J. F.; NGUYEN, M. T.; SCHULTZ, S. L.; CRUM, M. T.; STARKE, J. A.; BUTKUS, M. A.; BOWMAN, D. D.; LABARE, M. P. Inactivation of the bacterial pathogens *Staphylococcus pseudintermedius* and *Acinetobacter baumannii* by butanoic acid. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 752-763, 2019.

KIM, K. S.; LEE, S.; RYU, C. M. Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance. **Nature Communications**, v. 4, p. 1-12, 2013.

LANÇAS, F. M. **Espectrometria de massas: fundamentos, instrumentação e aplicações**. Campinas, SP: Editora Átomo, 2019.

LIN, S. Y.; OKUDA, S.; IKEDA, K.; OKUNO, T.; TAKANO, Y. LAC2 encoding a secreted laccase is involved in appressorial melanization and conidial pigmentation in *Colletotrichum orbiculare*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 12, p. 1552–1561, 2012.

LIU, C.; YIN, X.; WANG, Q.; PENG, Y.; MA, Y.; LIU, P.; SHI, J. Antagonistic activities of volatiles produced by two *Bacillus* strains against *Monilinia fructicola* in peach fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 15, p. 5756–5763, 2018.

MARTINS, S. J.; FARIA, A. F.; PEDROSO, M. P.; CUNHA, M. G.; ROCHA, M. R.; MEDEIROS, F. H. V. Microbial volatiles organic compounds control anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biological Control**, v. 131, n. September 2018, p. 36–42, 2019.

MAUGHAN, H.; VAN DER AUWERA, G. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 789–797, 2011.

MCGENITY, T. J.; CROMBIE, A. T.; MURRELL, J. C. Microbial cycling of isoprene, the most abundantly produced biological volatile organic compound on Earth. **ISME Journal**, v. 12, n. 4, p. 931–941, 2018.

MELO, M. P. D. E. Espécies biológicas e filogenéticas do complexo *Fusarium fujikuroi*, 2014. 132 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; DE BRUIJN, I.; DEKKERS, E.; VAN DER VOORT, M.; SCHNEIDER, J. H. M.; PICENO, Y. M.; DESANTIS, T. Z.; ANDERSEN, G. L.; BAKKER, P. A. H. M.; RAAIJMAKERS, J. M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, v. 332, n. 6033, p. 1097–1100, 2011.

MORITA, T.; TANAKA, I.; RYUDA, N.; IKARI, M.; UENO, D.; SOMEYA, T. Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. 1–8, 2019.

MYO, E. M.; LIU, B.; MA, J.; SHI, L.; JIANG, M.; ZHANG, K.; GE, B. Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. **Biological Control**, v. 134, n. March, p. 23–31, 2019.

NASCIMENTO, R. F. DO; LIMA, A. C. A. DE; BARBOSA, P. G. A.; SILVA, V. P. A. DA. **Cromatografia gasosa Aspectos teóricos e práticos**. Fortaleza: Imprensa Universitária da UFC, 2018. 334 p.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABDALLAH, E. F. *Bacillus*: a biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 667, p. 1–14, 2017.

RAJAOFERA, M. J. N.; WANG, Y.; DAHAR, G. Y.; JIN, P.; FAN, L.; XU, L.; LIU, W.;

- MIAO, W. Volatile organic compounds of *Bacillus atrophaeus* HAB-5 inhibit the growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 156, n. December 2018, p. 170–176, 2019.
- RATH, M.; MITCHELL, T. R.; GOLD, S. E. Volatiles produced by *Bacillus mojavenis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent. **Microbiological Research**, v. 208, n. August 2017, p. 76–84, 2018.
- REZENDE, C. D.; FIALHO, B. M.; BRAND, C. S.; BLUMER, S.; PASCHOLATI, F. S. Antimicrobial activity of volatile organic compounds and their effect on lipid peroxidation and electrolyte loss in *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* mycelia. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 23, p. 1527–1535, 2015.
- ROILIDES, E.; IOSIFIDIS, E. Acquired resistance in fungi: how large is the problem? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 790–791, 2019.
- RYU, C. M.; FARAG, M. A.; HU, C. H.; REDDY, M. S.; WEI, H. X.; PARÉ, P. W.; KLOEPPER, J. W. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 8, p. 4927–4932, 2003.
- SALWAN, R.; PRADESH, H.; RIALCH, N. Bioactive Volatile Metabolites of *Trichoderma*: An overview. **Springer, Singapore**, p. 87–111, 2019.
- SAXENA, A. K.; KUMAR, M.; CHAKDAR, H.; ANUROOPA, N.; BAGYARAJ, D. J. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1–12, 2019.
- SCHMIDT, R.; ETALO, D. W.; DE JAGER, V.; GERARDS, S.; ZWEERS, H.; DE BOER, W.; GARBEVA, P. Microbial small talk: Volatiles in fungal-bacterial interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JAN, p. 1–12, 2016.
- SILVERSTEIN, R. B.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2015.
- SUMI, C. D.; YANG, B. W.; YEO, I. C.; HAHM, Y. T. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. **NRC Research Press**, v. 61, n. 30, p. 93-103
- SYED AB RAHMAN, S. F.; SINGH, E.; PIETERSE, C. M. J.; SCHENK, P. M. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. **Plant Science**, v. 267, n. November 2017, p. 102–111, 2018.
- TAHIR, H. A. S.; GU, Q.; WU, H.; NIU, Y.; HUO, R.; GAO, X. *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. **Scientific Reports**, v. 7, n. August 2016, p. 1–15, 2017.
- TAHIR, H. A. S.; GU, Q.; WU, H.; RAZA, W.; HANIF, A.; WU, L.; COLMAN, M. V.; GAO, X. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, p. 1–11, 2017.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523–530, 2000.

XIE, S.; ZANG, H.; WU, H.; RAJER, F. U.; GAO, X. Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 1, p. 49–58, 2018.

YUAN, J.; RAZA, W.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5942–5944, 2012.

ZHANG, X.; GAO, Z.; ZHANG, X.; BAI, W.; ZHANG, L.; PEI, H.; ZHANG, Y. Control effects of *Bacillus siamensis* G-3 volatile compounds on raspberry postharvest diseases caused by *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. **Biological Control**, v. 141, n. September 2019, p. 104135, 2020.

ZHANG, Y.; LI, T.; LIU, Y.; LI, X.; ZHANG, C.; FENG, Z.; PENG, X.; LI, Z.; QIN, S.; XING, K. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41 as biological fumigants to control *Ceratocystis fimbriata* in postharvest sweet potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 13, p. 3702–3710, 2019.

ZOU, C.; LI, Z.; YU, D. *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. **Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 460–466, 2010.

ZUBROD, J. P.; BUNDSCHUH, M.; ARTS, G.; BRÜHL, C. A.; IMFELD, G.; KNÄBEL, A.; PAYRAUDEAU, S.; RASMUSSEN, J. J.; ROHR, J.; SCHARMÜLLER, A.; SMALLING, K.; STEHLE, S.; SCHULZ, R.; SCHÄFER, R. B. Fungicides: An overlooked pesticide class? **Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 7, p. 3347–3365, 2019.