

Purificação de Metabólitos Rizobacterianos com Atividade Contra *Meloidogyne exigua* Goeldi do Cafeeiro.

Hudson W. P. Carvalho (IC)¹, Alexandro S. Nunes (PG)¹, Geraldo H. Silva (PQ)², Alberto J. Cavalheiro (PQ)², Vicente P. Campos (PQ)³, Denilson F. Oliveira (PQ)^{1*}. (denilson@ufla.br)

¹ Departamento de Química-UFLA, ² Instituto de Química-Unesp, ³ Departamento de Entomologia- UFLA.

Palavras Chave: Nematóides, Rizobactérias, Purificação.

Introdução

O Brasil destaca-se como um dos principais produtores mundiais de café com mais 2,99 milhões de hectares plantados¹. Um dos grandes problemas enfrentados pela cafeicultura brasileira tem sido o ataque de fitonematóides. Estima-se que os prejuízos causados pelos nematóides possam chegar a R\$ 1 bilhão por ano³. Dentre esses fitopatógenos pode-se mencionar *Meloidogyne exigua* Goeldi, que ataca as raízes do cafeeiro, causando um engrossamento anormal dos tecidos radiculares. Isso acarreta deficiências nutricionais e consequente queda na produção.

Na literatura são encontrados vários trabalhos sobre substâncias produzidas por rizobactérias, que têm sido empregadas com sucesso no controle de fitonematóides. Com vistas a contribuir para o desenvolvimento de novas substâncias com propriedades nematocidas, buscou-se neste trabalho isolar substâncias potencialmente ativas contra nematóides a partir de metabólitos rizobacterianos.

Resultados e Discussão

A bactéria denominada *Bacillus megaterium*, previamente isolada e selecionada por sua atividade nematocida, foi cultivada em meio líquido Tryptic Soy Broth (TSB), mantido em incubadora a 25° C, com agitação orbital por 10 dias. Após este período a cultura foi centrifugada, obtendo-se assim uma fase líquida, que foi concentrada por liofilização. O resíduo obtido foi submetido à sucessivas extrações com hexano, AcOEt e MeOH. Alíquotas das frações obtidas foram solubilizadas em solução aquosa de Tween 80 a 1%(g/mL) e, em seguida, submetidas a testes com juvenis do segundo estágio (J2) de *M. exigua*. Para a realização dos testes colocaram-se 20 µL de suspensão aquosa contendo aproximadamente 20 J2, 100 µL da solução a ser avaliada e 30 µL de pentabiótico 3000 ppm (g/mL) em cavidades de 300 µL de placas Elisa. Os experimentos foram realizados com 6 repetições, empregando-se Tween 80 a 1% e o nematocida Aldicarb como testemunhas negativa e positiva, respectivamente.

Os ensaios biológicos indicaram que a fração insolúvel nos solventes empregados causava 100 % de mortalidade de J2. Em decorrência, esta 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

fração foi submetida a sucessivos fracionamentos por cromatografia líquida em coluna de sílica gel do tipo *flash*, monitorada por cromatografia em camada delgada e por testes *in vitro* com J2 de *M. exigua*. Estes procedimentos permitiram obter-se uma fração polar com alta atividade contra J2 que, em seguida, foi purificada por cromatografia líquida em resina Amberlite XAD-16. Obteve-se uma fração aquosa com atividade contra J2 que, segundo análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de UV, espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM) acoplado a CLAE por interface do tipo *electrospray*, tinha o aminoácido leucina ou/e isoleucina como um dos componentes principais. Tal resultado está de acordo com o fato dessa substância, obtida de fontes comerciais, ter-se mostrado ativa contra J2 de *M. exigua* nas mesmas condições de teste da fração ativa.

Conclusões

O fracionamento dos metabólitos produzidos pela rizobactéria *Bacillus megaterium*, direcionado por testes *in vitro* com J2 de *M. exigua*, permitiu a obtenção de uma fração com atividade nematocida que, segundo análises espectrométricas preliminares, tem como um dos constituintes principais o aminoácido leucina ou/e isoleucina.

Agradecimentos

Os Autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pelos recursos financeiros e bolsas alocados na execução deste trabalho.

¹ Min. da Agricultura, site <http://www.agricultura.gov.br>, consultado em 10 de janeiro de 2006.

² Kimati, H....[et al]. Manual de fitopatologia. 3ª Edição, Agronômica Ceres, São Paulo, p.197, 1997.

³ Santos, J. M. Fatos e efeitos relevantes na história da nematologia do Brasil e principais desafios para o início do novo século. XX Congresso Brasileiro de nematologia. 2000.