

Purificação de Substância do Metabolismo Bacteriano com Atividade *in vitro* contra *Meloidogyne exigua* do Cafeeiro.

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

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

Palavras Chave: Nematóides, Bactérias, Purificação .

Introdução

O Brasil destaca-se com um dos principais produtores mundiais de café, com mais de 2,99 milhões de hectares plantados¹.

Estima-se que 20 % das perdas de produtividade relacionadas ao café estejam ligadas à ação de fitonematóides, dentre os quais pode-se destacar *Meloidogyne exigua* Goeldi, também conhecido como nematóide das galhas do cafeeiro. Este fitonematóide é o mais disseminado entre os cafezais brasileiros².

Metabólitos bacterianos vêm sendo relatados na literatura como uma das novas vertentes no controle de nematóides³. Conseqüentemente, com vistas a contribuir para o desenvolvimento de novos produtos com atividade contra *M. exigua*, neste trabalho buscou-se purificar a substância com atividade nematicida de origem bacteriana

Resultados e Discussão

A bactéria *Bacillus pumillus*, previamente isolada e selecionada por sua atividade nematicida, 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 extração com 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 de 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 nematicida Aldicarb como testemunhas negativa e positiva, respectivamente.

A fração metanólica apresentou os maiores índices de mortalidade contra J2. Em decorrência, tal amostra foi submetida a sucessivos fracionamentos por cromatografia líquida do tipo *flash* com sílica gel e 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de sílica gel-C18, biodirecionados por testes *in vitro* com J2.

Esses procedimentos permitiram isolar uma fração sólida com coloração amarelada e elevado teor de pureza segundo análises cromatográficas, que foi submetida a análises iniciais por espectrometria de massas e de ressonância magnética nuclear (RMN).

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C em D₂O não apresentaram nenhum sinal, mesmo em elevadas concentrações. Já no espectro de massas obtido no modo positivo, após ionização em interface do tipo *electrospray*, observou-se apenas um pico com massa 85, que provavelmente correspondia a M+H. Já no modo negativo nenhum pico com intensidade acima da linha de ruídos foi observado. Os resultados até o momento obtidos sugerem que a substância isolada tenha fórmula molecular N₆.

Conclusões

O fracionamento biodirecionado dos metabólitos produzidos pela bactéria *Bacillus pumillus* permitiu isolar uma substância ativa contra *Meloidogyne exigua*. Análises iniciais de tal substância sugerem que sua fórmula molecular seja N₆.

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, p197, 1997.

³ Naves, R. L., Campos, V. P. e Souza, R. M. *Fitopatol. bras.*, 2004, vol.29, no.4, p.384-388