



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

LUÍS FERNANDO DE OLIVEIRA

Investigação do perfil metabólico do "Biofertilizante Vorax[®]" obtido através do processo de fermentação de *Corynebacterium glutamicum* e seu potencial uso na agricultura

CAMPINAS

2022

Luís Fernando de Oliveira

Investigação do perfil metabólico do "Biofertilizante Vorax[®]" obtido através do processo de fermentação de *Corynebacterium glutamicum* e seu potencial uso na agricultura

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química na área de Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Taicia Pacheco Fill

O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno Luís Fernando de Oliveira e orientada pela Profa. Dra. Taicia Pacheco Fill.

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

Oliveira, Luís Fernando de, 1987-
OI4i Investigação do perfil metabólico do "Biofertilizante Vorax[®]" obtido através do processo de fermentação de *Corynebacterium glutamicum* e seu potencial uso na agricultura / Luís Fernando de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Taicia Pacheco Fill.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Biofertilizantes. 2. *Corynebacterium glutamicum*. 3. Metabólitos. I. Fill, Taicia Pacheco, 1983-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Investigation of the metabolic profile of "Vorax Biofertilizer[®]" obtained through the fermentation process of *Corynebacterium glutamicum* and its potential use in agriculture

Palavras-chave em inglês:

Biofertilizers

Corynebacterium glutamicum

Metabolites

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Taicia Pacheco Fill [Orientador]

Cassiana Carolina Montagner

Célio Fernando Figueiredo Angolini

Data de defesa: 04-02-2022

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: orcid.org/0000-0001-6863-2694

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7364988623542647>

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Taicia Pacheco Fill (Orientadora)

Profa. Dra. Cassiana Carolina Montagner (UNICAMP)

Prof. Dr. Célio Fernando Figueiredo Angolini (Universidade Federal do ABC)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno Luís Fernando de Oliveira, aprovada pela Comissão Julgadora em 4 de fevereiro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João e Edna, por me conceberem neste mundo. Por batalharem por condições dignas para mim e minhas queridas irmãs e por nos propiciarem aquilo que jamais tiveram. Pelas conversas, divergências e todos os ensinamentos. Por serem as pessoas maravilhosas que são.

Às minhas irmãs, Thais e Caroline, por serem minhas primeiras amigas. Por toda ludicidade que tivemos na nossa infância. Por me presentear com meus sobrinhos lindos, Lara, Benício e Samuel.

À minha querida companheira Mariana, por me apoiar em todos os momentos. Por estar sempre ao meu lado afinal, sem você, talvez este sonho não se realizasse. Pela paciência e por aceitar dividir comigo alegrias e tristezas. Você me faz crescer a cada dia mais. Espero poder sempre retribuir a altura.

Aos meus amigos Renato, Clanderson, Lucas, Yuri, Gabriel Batista, Cristiane Naffah, Homero, Gabriel dos Santos, Murilo (quem é “Murilo”, rs) e outros por me aceitarem como sou. Por adicionarem em mim “partes” de vocês. Por deixarem a vida mais leve e gostosa.

À minha orientadora, professora Dra. Taícia Fill, pela confiança, pelo conhecimento transmitido e, acima de tudo, pela amizade. O mundo precisa de mais profissionais como você.

A todos os alunos e funcionários do Laboratório de Biologia Química Microbiana (LABIOQuiMi), em especial àqueles que se tornaram mais do que colegas de profissão, mas sim amigos, Stephanie (a pequena grande Teté – obrigado por tudo, parceirinha), Éder (e seu chumbinho), João Guilherme e Alana.

Às pessoas de outros laboratórios, professora Dra. Lujbica Tasić, Dra. Daniela Stanisić, Luidy Darlan pela amizade, pelo auxílio dado e pelas risadas e cafés divididos. À professora Dra. Ana Lucia Tasca Goes Ruiz e Lana Pereira Soares do LAFTex pelo auxílio com os ensaios antiproliferativos *in vitro*.

À empresa Microquímica/Tradecorp, Rafael, Odacir, Roberto, Siegler, Fernando, Dayane pela confiança e financiamento do projeto. Um agradecimento especial ao Rodrigo Repke por toda a ajuda na elaboração e execução dos experimentos de campo. Você é um cara sensacional.

À empresa ApexScience pelo cuidado na realização das análises instrumentais.

Ao Instituto de Química da UNICAMP pela possibilidade de usufruir da infraestrutura, contribuição na formação profissional e a todos os seus funcionários e prestadores de serviço do pelo trabalho indispensável que realizam.

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

“...And in the end

The love you take

Is equal to the love you make.”

- The Beatles, *The end*.

RESUMO

A utilização de biofertilizantes na agricultura apresenta muitos benefícios quando comparada ao uso de fertilizantes sintéticos, pois além de fornecerem alguns nutrientes necessários ao desenvolvimento e de fortalecerem os sistemas de defesa das plantas, diminuem o risco de contaminação ambiental e possuem um menor custo. Neste sentido, este trabalho teve o objetivo de analisar o perfil químico do biofertilizante comercial Vorax[®] que é produzido através da fermentação da bactéria *Corynebacterium glutamicum* em melaço de cana de açúcar e, assim, avaliar seu potencial frente à cultura de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Buscou-se investigar metabólitos que estejam presentes no biofertilizante e que possam estar relacionados ao aumento na produção de culturas agrícolas, visto que a interação presente entre este produto e a planta ainda não estão totalmente elucidadas na literatura. Através do uso da técnica analítica cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas juntamente a ferramentas computacionais (*Molecular Networking*) foi realizada a identificação putativa de moléculas presentes no produto e que poderiam ser alusivas à bioatividade em plantas. Foram examinadas, também, amostras de etapas que compõem o processo produtivo do biofertilizante objetivando compreender a origem e a evolução dos metabólitos anotados. Na tentativa de simplificar esta complexa matriz, uma purificação parcial do produto foi realizada. Testes de aplicação foliar em plantas de feijão bem como de testes de germinação com sementes desta planta foram realizados visando comparar a ação do biofertilizante e suas frações obtidas diante a amostras tratadas apenas com água. Resultados obtidos sugerem que algumas frações purificadas do biofertilizante apresentaram respostas semelhantes e em alguns casos superiores ao produto completo. Entretanto, este foi capaz de aumentar substancialmente produção de clorofilas totais nas plantas tratadas. Avaliou-se, também, a possibilidade de ação antifúngica do produto através de ensaios de concentração mínima inibitória contra as cepas dos fungos *Penicillium digitatum* e *Fusarium graminearum*, sendo estes dois microrganismos responsáveis por grandes prejuízos às culturas de citros e de grãos, respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que o produto não apresenta ação antifúngica frente a estes microrganismos. Por fim, buscou-se avaliar a segurança no manuseio do produto por meio de testes antiproliferativos utilizando células de queratinócitos humanos imortalizados. Dado que o

biofertilizante não foi capaz de inviabilizar a proliferação das células utilizadas conclui-se que o mesmo apresenta segurança em seu manuseio frente à cultura celular estudada.

ABSTRACT

The biofertilizers use in agriculture has many benefits when compared to synthetic fertilizers, because it provides some needed nutrients for plants defense systems development and strengthening; it reduces environmental contamination risks and have a lower cost. In this sense, this work aims to analyze the chemical profile of the Vorax® commercial biofertilizer produced through the *Corynebacterium glutamicum* fermentation in sugarcane molasses and evaluate its potential at the bean crop (*Phaseolus vulgaris*). We sought to investigate metabolites that are present in the biofertilizer and those who may be related to the increase in the production of crops with an important impact on national agriculture, since the interaction between this product and the plant is not yet fully elucidated in the literature. Using the ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in combination with computational tools (Molecular Networking), a putative identification of molecules present in the product was carried out. Samples of the biofertilizer's production process periods were analyzed in order to understand the pathway of the annotated metabolites. In an attempt to simplify this complex matrix, a partial purification of the product was carried out. Foliar application tests on bean plants as well as germination tests with seeds of this plant were carried out in order to compare the biofertilizer action and its obtained fractions against samples treated only with water. Obtained results suggest that some purified biofertilizer fractions showed similar responses and even higher than the complete product at some cases. However, it was able to substantially increase total chlorophyll production in the treated plants. A possibility of the product's antifungal action was also evaluated through minimum inhibitory concentration tests against the *Penicillium digitatum* and *Fusarium graminearum* fungal strains, these two microorganisms being responsible for great damage to citrus and grain cultures, respectively. Results suggest that the product does not have any antifungal action against these microorganisms. Finally, we sought to assess the safety in handling the product through antiproliferative tests using immortalized human keratinocyte cells. Since the biofertilizer was not able to prevent the proliferation of the cells used, it can be concluded that it is safe to handle, at least considering the studied cell culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Uso de fertilizante por hectare de terra cultivável em 2015. A faixa de consumo do Brasil encontra-se na mesma média que países como os Estados Unidos, México, Venezuela e Peru. Na América do Sul, Apenas a Colômbia e Chile são indicados com consumos em faixas superiores.	24
Figura 2. Mercado de biofertilizantes, por região no mundo. América do Norte e Central, Europa e Rússia possuem alta taxa de crescimento no mercado de biofertilizantes. América do Sul, Oriente Médio, Ásia e Oceania situam-se na taxa de crescimento médio no que se refere ao consumo de biofertilizantes, enquanto que a África apresenta uma baixa taxa de crescimento no consumo de biofertilizantes.....	26
Figura 3. O biofertilizante Vorax® e análise composicional percentual obtido em análises laboratoriais anteriores.....	27
Figura 4. <i>Corynebacterium glutamicum</i> colocadas em uma membrana nucleopore e visualizadas por microscopia eletrônica de varredura.	28
Figura 5. Representação das interações entre a comunidade de produtos naturais, bibliotecas espectrais do GNPS e seus conjuntos de dados.	30
Figura 6. Exemplo de redes moleculares obtidas através do <i>Feature-based Molecular Networking</i> através de análises de UHPLC-UV-HRMS/MS, em modo negativo, de diversas partes de plantas de batatas yacon a) Rede molecular inteira, indicando que os grupos de ésteres de ácido cafeico representam a maior parte dos nodos formados. O tamanho dos nodos representa diferenças semi-quantitativas nas concentrações dos metabólitos em cada extrato da planta analisada, enquanto que as cores dos nodos estão relacionadas à presença de cada metabólito em diferentes órgãos b) Nodos amplificados de ésteres de ácido cafeico e suas identificações de fórmulas estruturais. Nodos circulados em amarelo foram isolados e caracterizados e nodos circulados em azul tiveram sua anotação por derreplicação.	32
Figura 7. Visão esquemática global da formação das redes moleculares na ferramenta <i>MolNetEnhancer</i>	33
Figura 8. Níveis de confiança na identificação de compostos para estudos de metabolômica.	35
Figura 9. Etapas que compõem o processo produtivo do biofertilizante. Maiores informações acerca do processo não podem ser informadas por sigilo industrial. ...	38

Figura 10. Esquema ilustrativo dos passos utilizados na extração em larga escala do biofertilizante para obtenção de frações do mesmo. O concentrado do biofertilizante obtido após a extração líquido-líquido foi submetido a uma purificação parcial. As 60 frações obtidas após a purificação foram analisadas em um HPLC-DAD e, finalmente, agrupadas em 6 frações de acordo com seu perfil espectral.....	40
Figura 11. Esquema ilustrativo para realização dos ensaios de germinação de sementes utilizando as soluções do biofertilizante e das frações deste.....	44
Figura 12. Diagrama de Venn mostrando a distribuição dos metabólitos identificados putativamente pela base de dados GNPS através da extração do biofertilizante Vorax® com os solventes citados, utilizando um HPLC-MS/MS, no modo positivo...	49
Figura 13. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 281.2484, com detecção para o metabólito ácido linoleico, no tempo de retenção 8.20 min. b) <i>Mirror Match</i> do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 281.2484, com anotação para o ácido linoleico. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo <i>hit</i> proposto pela plataforma, em verde. c) Fórmula estrutural e molecular do ácido linoleico.	51
Figura 14. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 279.2327, com detecção para o metabólito ácido linolênico, no tempo de retenção 8.04 min. b) <i>Mirror Match</i> do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 281.2484, com anotação para o ácido linoleico. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo <i>hit</i> proposto pela plataforma, em verde. c) Fórmula estrutural e molecular do ácido linolênico.	52
Figura 15. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H-H_2O]^+$ m/z 247.1329, com detecção para o metabólito ácido abscísico, no tempo de retenção 4.13 min. b) <i>Mirror Match</i> do GNPS para o íon $[M+H-H_2O]^+$ m/z 247.1329, com anotação para o ácido abscísico. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo <i>hit</i> proposto pela plataforma, em verde. c) Fórmula estrutural e molecular do ácido abscísico.	53

Figura 16. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 204.1244, com detecção para o metabólito N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina, no tempo de retenção 2.63 min. b) *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 204.1244, com anotação para a N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. c) Fórmula estrutural e molecular da N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina.54

Figura 17. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 204.1244, com anotação para o metabólito N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina, no tempo de retenção 2.63 min, para o extrato do biofertilizante. b) *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 204.1244, com anotação para a N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. c) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 204.1244 do padrão de N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina (Sigma-Aldrich), no tempo de retenção 2.62 min. d) Fragmentação MS/MS obtida para o padrão da citocinina N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina, obtida no tempo de retenção 2.62 min. Observa-se a compatibilidade entre as fragmentações obtidas para a detecção obtida pela plataforma GNPS para o pico base m/z 136.0621 e para os picos obtidos de menor intensidade m/z 148.0616 e m/z 69.0704.....56

Figura 18. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 148.0606, com detecção para o metabólito ácido glutâmico, em 0.75 min. b) *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 148.0606. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. c) Fórmula estrutural e molecular do ácido glutâmico.57

Figura 19. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 199.0608, com detecção para o metabólito ácido siríngico, em 2.58 min. b) *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 199.0608. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem

ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. c) Fórmula estrutural e molecular do ácido siríngico.58

Figura 20. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 165.0547, com detecção para o metabólito ácido *p*-cumárico, em 3.07 min. b) *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 165.0547. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. c) Fórmula estrutural e molecular do ácido *p*-cumárico.59

Figura 21. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 161.0598, com detecção para o metabólito 6-metil cumarina, em 2.37 min. b) *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 161.0598. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. c) Fórmula estrutural e molecular da 6-metil cumarina.60

Figura 22. Gráficos de *scores* 2D referentes ao a) PCA e b) PLS-DA para os dados obtidos através das análises de UHPLC-MS/MS dos períodos de produção do biofertilizante Vorax[®].64

Figura 23. a) *Loadings Plot* onde cada um dos pontos roxos representa um *feature* e b) *VIP scores* obtido ds análise PLS-DA mostrando os ID's dos *features* significativos., ou seja, aqueles que mais contribuem para a separação entre os grupos analisados.66

Figura 24. a) Anotação das superclasses químicas dos compostos presentes nos períodos de produção do biofertilizante Vorax[®] realizada através de análises *in silico*, utilizando a ferramenta *MolNet Enhancer*. b) Composição percentual dos compostos pertencentes aos períodos de produção do biofertilizante anotados pelo *MolNet Enhancer*.67

Figura 25. Anotação das classes químicas (nível 3) dos compostos presentes no processo de produção do biofertilizante Vorax[®] realizada através de análises *in silico*, utilizando a ferramenta *MolNet Enhancer*.68

Figura 26. a) Redes moleculares totais formadas pelo *MolNet Enhancer*, com destaque para metabólitos pertencentes à classe dos terpenóides. b) Famílias espectrais de metabólitos pertencentes à classe dos terpenóides. O anel interno dos

nodos indica que os metabólitos desta classe de compostos são, quase que em sua totalidade, produzidos após a inoculação da *C. glutamicum* no meio de cultivo.69

Figura 27. a) Família espectral de metabólitos pertencentes à classe dos terpenóides b) *feature* 176, referente ao metabólito *m/z* 695.5101 c) *feature* 189, referente ao metabólito *m/z* 724.5312 d) *feature* 1103, referente ao metabólito *m/z* 789.5806 e) *feature* 1629, referente ao metabólito *m/z* 818.6014. Os gráficos *boxplot* apresentam a área referente ao pico cromatográfico de cada metabólito para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização realizada no tratamento dos dados.70

Figura 28. Biossíntese de carotenoides em *C. glutamicum*. 1) isopentenil pirofosfato 2) dimetilalil pirofosfato 3) geranil pirofosfato 4) farnesil pirofosfato 5) geranilgeranil pirofosfato 6) fitoeno 7) licopeno 8) flavuxantin 9) decaprenoxantin A) prenil transferase B) fitoeno sintase C) fitoeno dessaturase D) licopeno elongase E) carotenoide- ϵ -ciclase.72

Figura 29. a) Família espectral pertencente à classe dos terpenóides. b) Gráfico *boxplot* das áreas referente ao pico cromatográfico correspondente ao *feature* 220 (metabólito *m/z* 701.5289) para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização realizada no tratamento dos dados c) Anotação de metabólito sugerida pelo *Networking Annotation Propagation*, com ionização $[M+H]^+$ d) Fórmula estrutural da decaprenoxantina, um dos carotenoides sintetizados pela *Corynebacterium glutamicum*. Este metabólito não foi anotado nas redes moleculares formadas.73

Figura 30. Destaque para uma família espectral da classe dos compostos orgânicos nitrogenados. O *feature* 1083 (metabólito *m/z* 650.4943) foi indicado como diferencial pelo VIP scores do PLS-DA. O gráfico *boxplot* indica a área do pico cromatográfico referente a este metabólito para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados.74

Figura 31. a) *Feature* 1244 (*m/z* 165.1387) indicado como diferencial pelo VIP scores do PLS-DA. b) Gráfico *boxplot* indicando a área do pico cromatográfico referente a este metabólito para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. c) Fórmula química estrutural da trimetilpropilpirazina. ...75

Figura 32. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ *m/z* 165.1388 no biofertilizante Vorax, no tempo de retenção 3.71 min. b) MS/MS obtido para o metabólito c) Fórmula estrutural da trimetilpropilpirazina, anotada a nível 3.75

Figura 33. a) Nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 204.1242, anotado como N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina e agrupado na classe química das imidazopirimidinas. b) Gráfico *boxplot* indicando a área do pico cromatográfico referente a este metabólito para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. c) Fórmula estrutural da N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina.....76

Figura 34. Biossíntese da N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina em *C. glutamicum*. 1) Dimetilalil difosfato 2) Adenosina trifosfato 3) Adenosina difosfato 4) Adenosina monofosfato 5) isopentenil-adenina ribosídeo 5'-trifosfato 6) isopentenil-adenina ribosídeo 5'-difosfato 7) isopentenil-adenina ribosídeo 5'-monofosfato 8) N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina A) dimetilaliltransferase B) fosfatase C) citocinina fosforibohidrolase “lonely guy” - LOG.....78

Figura 35. Identificação das vias metabólicas envolvidas de acordo com os genes presentes na cepa da *C. glutamicum*, utilizada para a fabricação do biofertilizante Vorax®. O estudo identificou 24% dos genes totais da bactéria. Os genes identificados na biossíntese de terpenóides confirmam que as enzimas presentes fazem parte da via do não-mavelonato.79

Figura 36. Resultados obtidos para a busca manual dos genes codificantes referentes à biossíntese das enzimas de terpenóides e de N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina. a) Genes codificantes da enzima fitoeno sintase. b) Genes codificantes da enzima fitoeno dessaturase (ou desidrogenase). c) Genes codificantes da enzima licopeno elongase. d) Genes codificantes da enzima carotenoide- ϵ -ciclase. e) Genes codificantes da enzima dimetilaliltransferase.81

Figura 37. a) Família espectral com anotação para a classe dos ácidos carboxílicos e derivados (com anotação de subclasse para aminoácidos), em destaque o nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 148.0605, anotado como ácido glutâmico. b) Gráfico *boxplot* indicando a área referente do pico cromatográfico referente a este metabólito para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. c) Fórmula estrutural do ácido glutâmico.82

Figura 38. a) Família espectral com anotação para a classe dos flavonoides (com anotação de subclasse para flavonoides glicosilados), em destaque o nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 447.1285, anotado como swertisina. b) Gráfico *boxplot* indicando a área referente do pico cromatográfico referente a swertisina para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. c) Fórmula estrutural da swertisina. d) Nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 199.0601,

anotado como ácido siríngico. Não houve anotação de classe química. e) Gráfico *boxplot* indicando a área do pico cromatográfico referente ao ácido siríngico para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. f) Fórmula estrutural do ácido siríngico.83

Figura 39. a) Família espectral com anotação para a classe dos compostos orgânicos oxigenados b) Destaque do nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 252.1086, anotado como 2'-deoxiadenosina c) Gráfico *boxplot* indicando a área referente do pico cromatográfico referente a 2'-deoxiadenosina para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados d) Fórmula estrutural da 2'-deoxiadenosina. e) Nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 256.1332, anotado como N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)benzamida e anotação para a classe dos compostos benzênicos e derivados f) Gráfico *boxplot* indicando a área do pico cromatográfico referente a N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)benzamida para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados g) Fórmula estrutural da N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)benzamida. h) Nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 324.2897, anotado como linoleil etanolamida e anotação para a classe decompostos orgânicos nitrogenados i) Gráfico *boxplot* indicando a área do pico cromatográfico referente a linoleil etanolamida para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. j) Fórmula estrutural da linoleil etanolamida.....84

Figura 40. a) Família espectral com anotação para a classe dos benzofuranos, em destaque o nodo pertencente ao íon $[M+NH_4]^+$ m/z 540.2440, anotado como 2-(hidroximetil)-6-[5-[3-(hidroximetil)-5-(3-hidroxipropil)-7-metoxi-2,3-diidro-1-benzofuran-2-il]-2-metoxifenoxi]oxano-3,4,5-triol b) Gráfico *boxplot* indicando a área referente do pico cromatográfico referente a este metabólito para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. c) Fórmula estrutural do metabólito d) Nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 387.2015, anotado como 2-Ciclohexen-1-ona, 4-[(1)-3-(β -D-glicopiranosiloxi)-1-buten-1-il]-4-hidroxi-3,5,5-trimetil e) Gráfico *boxplot* indicando a área do pico cromatográfico referente ao metabólito para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. f) Fórmula estrutural do 2-Ciclohexen-1-ona, 4-[(1)-3-(β -D-glicopiranosiloxi)-1-buten-1-il]-4-hidroxi-3,5,5-trimetil.....85

Figura 41. Resultados obtidos para os ensaios de germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* utilizando o biofertilizante Vorax[®] e as frações obtidas a partir

deste. a) Sementes germinadas ao final do experimento. Os gráficos *boxplot* b) e c) mostram, respectivamente, a dispersão dos valores de comprimento e massa obtidos para as raízes formadas para cada tratamento.87

Figura 42. Ensaio de aplicação foliar em plantas de *P. vulgaris* realizado em casa de vegetação a) Plantas de *P. vulgaris* 4 dias após semeadura b) Aplicação foliar das soluções 10 dias após semeadura c) Plantas de *P. vulgaris* 10 dias após semeadura d) Plantas de *P. vulgaris* no dia da avaliação (27 dias após semeadura) e) Clorofilômetro utilizado para leitura de clorofilas totais f) Avaliação do comprimento de raízes e partes aéreas das plantas g) Pós secagem da biomassa obtida h) Pesagem das raízes e partes aéreas das plantas do ensaio.89

Figura 43. Resultados obtidos para os ensaios de aplicação foliar em plantas de *P. vulgaris* utilizando o biofertilizante Vorax® e as frações obtidas a partir deste. Os gráficos *boxplot* a) e b) mostram, respectivamente, a dispersão dos valores de comprimento das raízes e parte aérea obtida para cada tratamento.90

Figura 44. Resultados obtidos para os ensaios de aplicação foliar em plantas de *P. vulgaris* utilizando o biofertilizante Vorax® e as frações obtidas a partir deste. Os gráficos *boxplot* a) e b) mostram, respectivamente, a dispersão dos valores de massa fresca das raízes e parte aérea obtida para cada tratamento e os gráficos *boxplot* c) e d) mostram, respectivamente, a dispersão dos valores de massa seca das raízes e parte aérea obtida para cada tratamento.....91

Figura 45. Valores médios de clorofilas totais em *Phaseolus vulgaris* obtidos para cada tratamento. As aplicações das soluções de biofertilizante e suas frações foram realizadas após *t0* e as leituras de clorofilas totais em *t1*, *t2* e *tf* foram realizadas nas semanas que sucederam a aplicação das soluções.93

Figura 46. Aumento percentual de clorofilas totais para cada tratamento entre os períodos *t0* e *tf*.94

Figura 47. Gráfico (em escala logarítmica) dos metabólitos anotados nas frações de 1 a 6. Cada uma das cores representa a fração analisada e o tamanho das barras compreende a intergal da área do pico correspondente a cada metabólito anotado. Na sequência: 1) Ácido glutâmico (*m/z* 148.0608), 2) *N*-(2-feniletil)acetamida (*m/z* 164.1071), 3) 2-Ciclohexen-1-ona, 4)-[(1)-3-(β-D-glicopiranosiloxi)-1-buten-1-il]-4-hidroxi-3,5,5-trimetil (*m/z* 387.2015), 4) 2-(hidroximetil)-6-[5-[3-(hidroximetil)-5-(3-hidroxipropil)-7-metoxi-2,3-diidro-1-benzofuran-2-il]-2-metoxifenoxi]oxano-3,4,5-triol (*m/z* 540.2441), 5) Ácido 13-ceto-9,11-octadecadienónico (*m/z* 295.2269), 6) Loliolide

(*m/z* 197.1180), 7) N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina (*m/z* 204.1245), 8) Ácido siríngico (*m/z* 199.0608), 9) Piridoxina (*m/z* 170.0817), 10) 2'-deoxiadenosina (*m/z* 252.1090), 11) *N*-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)benzamida (*m/z* 256.1332), 12) Swertisina (*m/z* 447.1285), 13) Ácido linoleico (*m/z* 281.2475), 14) Ácido linolênico (*m/z* 279.2318), 15) Ácido *p*-cumárico (*m/z* 165.0547), 16) 6-metil cumarina (*m/z* 161.0598), 17) Linoleoil etanolamida (*m/z* 324.2898), 18) Ácido abscísico (*m/z* 247.1329), 19) Jasmonoil leucina (*m/z* 324.2170), 20) (2,3,4,5,6)-2-[4-[(3,3a,6,6a)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrofuro[3,4-*c*]furan-6-il]-2,6-dimetoxifenoxi]-6-(hidroximetil)oxano-3,4,5-triol (*m/z* 598.2493).....95

Figura 48. Disposição para as concentrações de biofertilizante utilizadas no experimento de concentração mínima inibitória. O valor de concentração, em destaque, representa a concentração de aplicação do biofertilizante indicada pelo fabricante.....98

Figura 49. Placas de 96 poços dos ensaios de concentração mínima inibitória para os fungos *F. graminearum* (esquerda) e *P. digitatum* (direita) a) Primeiro dia da inoculação das soluções de esporos b) Após 96h inoculação das soluções de esporos.98

Figura 50. Influência do biofertilizante Vorax® (linhas azul e vermelha) e do quimioterápico Doxorubicina (linha preta) sobre a proliferação de queratinócitos humanos imortalizados HaCat após 48 horas de exposição.....100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros utilizados no <i>software</i> MZmine para a construção de tabelas de quantificação e, posteriormente, redes moleculares através do <i>MolNet Enhancer</i>	42
Tabela 2. Descrição das soluções utilizadas para cada tratamento no ensaio de aplicação foliar em <i>Phaseolus vulgaris</i>	45
Tabela 3. Metabólitos putativamente identificados no biofertilizante Vorax [®]	62

SUMÁRIO

1. Introdução	23
1.1 O uso de fertilizantes e a demanda na produção de alimentos	23
1.2 Produtos naturais microbianos e a utilização dos biofertilizantes	24
1.3 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	27
1.4 Metabolômica e Ferramentas de Bioinformática	28
1.5 Níveis de Anotação e Identificação	34
2. Objetivos	36
2.1 Objetivos Específicos	36
3. Materiais e Procedimentos	37
3.1 Investigação do perfil metabólico do biofertilizante Vorax®	37
3.2 Análises dos períodos de produção do biofertilizante Vorax®	38
3.3 Extração em larga escala e obtenção de frações do biofertilizante Vorax®	39
3.4 Utilização das Ferramentas de Bioinformática	41
3.4.1 Library Search	41
3.4.2 Feature-based Molecular Networking	41
3.4.3 Network Annotation Propagation	43
3.4.4 MolNetEnhancer	43
3.5 Ensaios <i>in vivo</i>	43
3.5.1 Ensaios de germinação de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i>	43
3.5.2 Ensaios de aplicação foliar em plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	44
3.6 Análises estatísticas	45
3.6.1 Análises estatísticas multivariadas das análises de UHPLC-MS/MS dos períodos de produção do biofertilizante Vorax®	45
3.6.2 Análises estatísticas univariadas das análises <i>in vivo</i> com <i>Phaseolus vulgaris</i>	46
3.7 Testes antifúngicos de soluções do biofertilizante Vorax® frente aos fungos <i>Fusarium graminearum</i> e <i>Penicillium digitatum</i>	46

3.8 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antiproliferativa do biofertilizante Vorax®	47
4. Resultados e Discussão	49
4.1 Investigação do perfil metabólico do biofertilizante Vorax®	49
4.2 Anotação de metabólitos presentes no biofertilizante	50
4.3 Análises multivariadas dos períodos de produção do biofertilizante Vorax®	64
4.3.1 Redes moleculares dos períodos de produção do biofertilizante e anotações obtidas.....	66
4.4 Ensaios <i>in vivo</i>	86
4.4.1 Germinação de sementes de <i>P. vulgaris</i> utilizando soluções do biofertilizante Vorax® e frações obtidas a partir de uma purificação parcial do mesmo	87
4.4.2 Aplicação foliar em plantas de <i>P. vulgaris</i> utilizando soluções do biofertilizante Vorax® e frações obtidas a partir de uma purificação parcial do mesmo	88
4.5 Análise composicional das Frações obtidas do biofertilizante Vorax®	94
4.6 Testes antifúngicos de soluções do biofertilizante Vorax® frente aos fungos <i>Fusarium graminearum</i> e <i>Penicillium digitatum</i>	97
4.7 Atividade Antiproliferativa do biofertilizante Vorax®	99
5. Conclusão	101
6. Referências	102
7. Apêndice	124

1. Introdução

1.1 O uso de fertilizantes e a demanda na produção de alimentos

A agricultura desempenha o papel fundamental de alimentar uma população global de mais de 7,5 bilhões de pessoas, além de prover fibras e ser o principal meio de sustento para milhões de pessoas (IPCC, 2014). Neste contexto, o Brasil está entre os principais produtores de alimento do mundo. Segundo dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas totalizou 240,6 milhões de toneladas em 2017, 29,5% superior à obtida no ano anterior (IBGE, 2017). Em 2019, o setor agropecuário correspondeu a 21,4% do PIB (Produto Interno Bruto) nacional (CEPEA, 2020). Porém, a necessidade na produção de alimentos deve se somar aos novos desafios a serem enfrentados pelo setor como o crescimento da população mundial para mais de 10 bilhões de pessoas até 2050, impactos sofridos devido às mudanças climáticas (FAO, 2017) e a imposição de se adequar aos acordos multilaterais oriundos destas mudanças (GRASSI *et al.*, 2017).

A substantiva elevação na oferta de alimentos está diretamente relacionada ao consumo de fertilizantes. A utilização dos fertilizantes químicos na agricultura tem um papel fundamental para a crescente oferta de alimentos a fim de suprir a população mundial (CHAUDHARY *et al.*, 2017). A **Figura 1** apresenta dados do consumo mundial de fertilizantes, onde pode ser visto que o consumo médio deste insumo no Brasil está entre 100 a 300 kg por hectare.

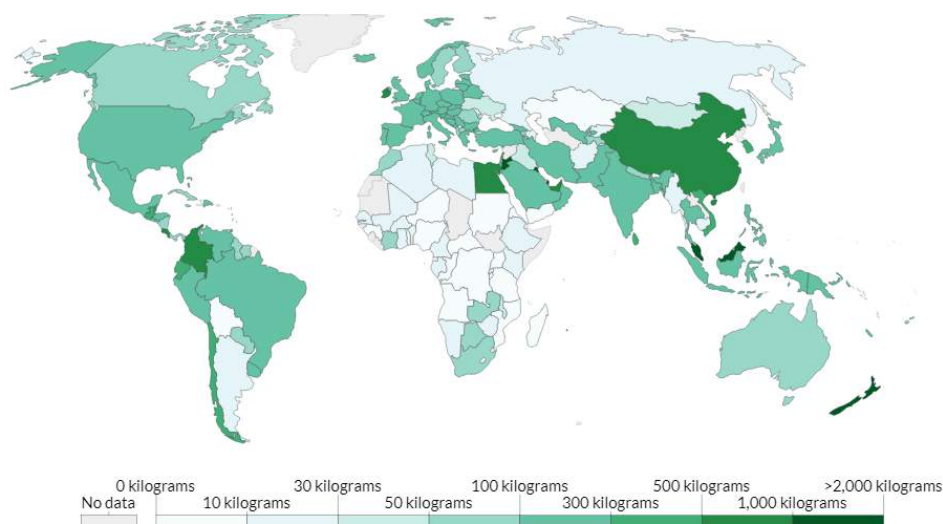


Figura 1. Uso de fertilizante por hectare de terra cultivável em 2015. A faixa de consumo do Brasil encontra-se na mesma média que países como os Estados Unidos, México, Venezuela e Peru. Na América do Sul, Apenas a Colômbia e Chile são indicados com consumos em faixas superiores. Fonte: World Bank/ Our World in Data (ROSER e RITCHIE, 2013).

Estima-se que apenas os fertilizantes nitrogenados sejam responsáveis por cerca de 40% da produção de alimentos no mundo (EMBRAPA, 2018) e que o mercado de fertilizantes totais apresente uma taxa de crescimento anual composta de 10,1% entre o período de 2021 a 2026 (MORDOR INTELLIGENCE, 2021). Entretanto, apesar da importância dos fertilizantes na produção dos alimentos, seu uso indiscriminado está associado a uma série de problemas ambientais, tais como poluição atmosférica e das águas subterrâneas, eutrofização, diminuição da fertilidade do solo dentre outros (MAHANTY *et al.*, 2016). Assim, o investimento em outras tecnologias capazes de ajudar no fornecimento de alimentos e fibras de forma a não incorrer em outros prejuízos ambientais torna-se cada vez mais emergente.

1.2 Produtos naturais microbianos e a utilização dos biofertilizantes

Há séculos os produtos naturais têm sido investigados pelo homem como modelos para a descoberta de compostos de grande valor agregado que vão de encontro à promoção significativa da qualidade de vida (SILVA, 2014). Devido ao seu potencial em síntese destes produtos, os microrganismos têm sido utilizados em análises deste âmbito, dada a sua capacidade de dispor de porções significativas de seus genomas à produção de metabólitos secundários. Tais metabólitos são compostos orgânicos que se formam ao final ou perto da fase estacionária de

crescimento destes microrganismos e não estão diretamente associados ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos mesmos (SINGH *et al.*, 2017). Muitos destes produtos podem apresentar inúmeras atividades biológicas, como a antibiótica, anticancerígena, inibidores enzimáticos, nutracêuticos, polímeros, surfactantes etc., tornando-os matérias-primas de interesse em muitas áreas industriais (DEMAIN, 2014). No setor agrícola, a utilização de microrganismos e/ou seus metabólitos já é bastante difundida para a fabricação de bioherbicidas (USTA, 2013), biofungicidas (CHANDLER *et al.*, 2011), reguladores do crescimento de plantas (TSAVKELOVA *et al.*, 2006) e biofertilizantes (SCHÜTZ *et al.*, 2018).

Com o objetivo de reduzir a dependência de fertilizantes sintéticos, os biofertilizantes mostram-se ecologicamente viáveis, baratos, acessíveis e podem ser usados como fonte suplementar de nutrientes (SUBBAIAH, 2019). A adição destes produtos traz benefícios, como o aumento da população de microrganismos, especialmente na rizosfera, além de melhorarem a condição do solo permitindo que este apresente condições físicas, químicas, nutricionais e biológicas favoráveis ao cultivo de determinadas culturas (CHAUDHARY *et al.*, 2018). Além disso, os biofertilizantes são capazes de ajudar no fortalecimento das plantas contra estresses bióticos e abióticos (BHARDWAJ *et al.*, 2014; MAHANTY *et al.*, 2016; SENEVIRATNE *et al.*, 2017).

Diferentes definições do termo “biofertilizante” têm sido adotadas. Vessey (2003) descreve como

uma substância que contém microrganismos vivos que, quando aplicado a sementes, superfícies de plantas ou solo, colonizam a rizosfera ou o interior da planta e promovem o crescimento, aumentando o fornecimento ou disponibilidade de nutrientes primários para a planta hospedeira.

Fuentes-Ramirez e Caballero-Mellado (2005) definem como “um produto que contém microrganismos vivos, que exercem efeitos benéficos diretos ou indiretos sobre o crescimento das plantas e o rendimento da colheita por meio de diferentes mecanismos”. No Brasil, biofertilizante é o “produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade” (BRASIL, 2004), não incluindo necessariamente microrganismos vivos em sua composição. O produto pode ser obtido mediante fermentação

aeróbica ou anaeróbica de matéria orgânica em meio líquido e possui características fertiprotetoras, podendo atuar como defensivos agrícolas (EMBRAPA, 2009).

Apesar de ainda discreto, estima-se que o mercado de biofertilizantes tenha movimentado entre 1 e 1,5 bilhão de dólares em 2020 com taxa de crescimento anual composta prevista entre 12,9% e 14,2% (AGRIBUSINESS INTELLIGENCE, 2019). Dessa maneira, os investimentos em pesquisa agrícola, com avanços em ciências e tecnologias são fundamentais para o contínuo êxito do setor. A **Figura 2** mostra que a América do Sul situa-se em uma região considerada de taxa de crescimento médio quanto ao uso e produção de biofertilizantes.



Figura 2. Mercado de biofertilizantes, por região no mundo. América do Norte e Central, Europa e Rússia possuem alta taxa de crescimento no mercado de biofertilizantes. América do Sul, Oriente Médio, Ásia e Oceania situam-se na taxa de crescimento médio no que se refere ao consumo de biofertilizantes, enquanto que a África apresenta uma baixa taxa de crescimento no consumo de biofertilizantes. Fonte: Mordor Intelligence, 2021.

Produzido pela empresa Microquímica Indústrias Químicas Ltda. (Campinas, São Paulo, Brasil), o biofertilizante Vorax[®] é um produto que apresenta ação bioestimulante. O processo de produção é realizado através da fermentação realizada pela bactéria *C. glutamicum* utilizando-se como meio de cultura o melaço de cana-de-açúcar esterilizado, sendo o microrganismo inativado ao final do processo. A *C. glutamicum* é capaz de utilizar muitos substratos como fontes de carbono, tais como glicose, sacarose, pentose, etanol e ácidos orgânicos, dentre outros (ZAHOOOR *et al.*, 2012), o que torna o melaço uma excelente opção para fonte de obtenção de energia. Desta maneira, o produto final é a soma dos compostos presentes no meio inicial e o extrato dos metabólitos produzidos por este microrganismo durante o processo de produção.

Análises laboratoriais prévias contratadas pela fabricante mostraram que pouco mais de 25% da composição do produto deve-se ao ácido glutâmico, sendo este um dos principais produtos de síntese da *C. glutamicum*. Outros aminoácidos respondem por pouco mais de 3% da composição do produto. A presença de açúcares diversos, tais como glicose, lactose e frutose somam perto de 18% e de vitaminas de classes diversas somam pouco mais de 0,1%. A **Figura 3** mostra um gráfico feito a partir destes estudos composicionais do biofertilizante.

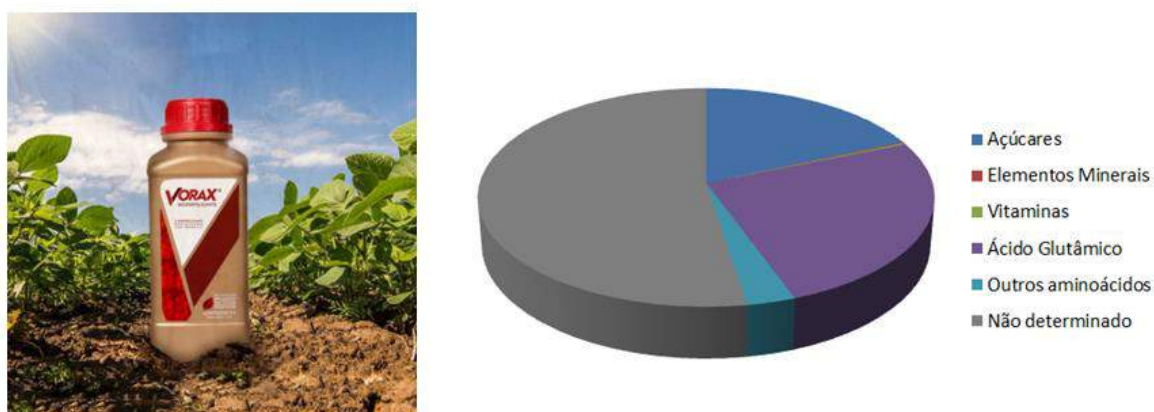


Figura 3. O biofertilizante Vorax® e análise composicional percentual obtido em análises laboratoriais anteriores. Fonte: Microquímica Tradecorp, 2021.

Visto que grande parte de sua composição não é determinada faz-se necessário caracterizar os metabólitos presentes no biofertilizante de modo a compreender melhor quais rotas metabólicas este é capaz de ativar quando aplicado às plantas.

1.3 *Corynebacterium glutamicum*

A *C. glutamicum* (**Figura 4**) é um microrganismo que tem destaque no âmbito industrial desde sua descoberta e isolamento, nos anos 1950. Sendo uma bactéria Gram-positiva em formato bastonete, este organismo apatogênico que não esporula é classificado como “geralmente considerado seguro” (GRAS - *generally regarded as safe*). Amplamente utilizada para a síntese biotecnológica de aminoácidos, ela tem sido aplicada em vários processos produtivos de compostos químicos de alto valor agregado, como combustíveis, polímeros e no avanço em sistemas biológicos e engenharia metabólica como um organismo chave (LEE, *et al.*, 2016; ZAHOOR *et al.*, 2012; HERMANN *et al.*, 2003; CHENG *et al.*, 2019; WENDISCH *et al.*, 2006; SASAKI *et al.*, 2019).

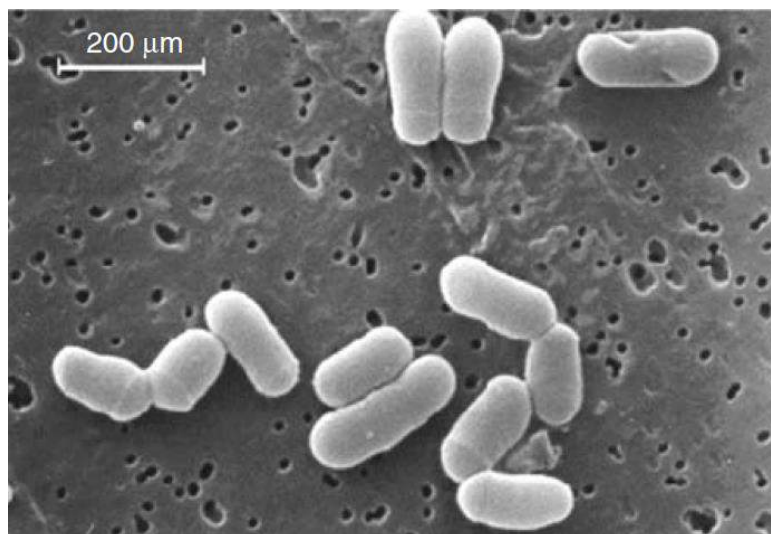


Figura 4. *Corynebacterium glutamicum* colocadas em uma membrana nucleopore e visualizadas por microscopia eletrônica de varredura. Fonte: EGDELING e BOTT, 2005.

Estudos anteriores verificou-se o grande potencial de aplicação dos extratos desta bactéria na agricultura, pois o tratamento de culturas como batata com os extratos obtidos a partir da fermentação da bactéria levou ao aumento de produtividade (RÖDER *et al.*, 2018). Dessa forma, torna-se necessário caracterizar quimicamente estes extratos e entender o papel dos metabólitos primários e secundários no aumento desta interessante produtividade. Isso poderia contribuir de maneira pragmática e direta para a agricultura brasileira e, conseqüentemente, para a economia do país.

1.4 Metabolômica e Ferramentas de Bioinformática

Metabolômica é uma abordagem que tem como objetivo identificar e quantificar um conjunto de metabólitos produzidos por um organismo e, assim, melhorar a compreensão das redes metabólicas e a subsequente composição bioquímica. A metabolômica alvo (*targeted metabolomics*) visa à análise de um ou mais metabólitos pré-selecionados que estejam associados a rotas metabólicas específicas, enquanto que a metabolômica não alvo (*untargeted metabolomics*) baseia-se na análise de metabólitos de diversas classes químicas inseridos no sistema biológico em estudo (CANUTO *et al.*, 2017). Os metabólitos são pequenas moléculas (peso molecular inferior a 1500 Da) que estão envolvidos no controle e regulação das funções celulares e podem ser precursores, intermediários ou produtos finais de vias metabólicas. São úteis para saber as condições em que o

meio se encontra, sendo utilizados para obter uma impressão digital de um estado fisiológico *versus* patológico. Podem ser utilizados, também, como biomarcadores para diagnósticos ou monitorar tratamentos (LAZAR *et al.*, 2015). A metabolômica nos permite que, através do uso de métodos analíticos, como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ou a espectrometria de massas (MS), diversas variáveis, tais como impacto do tempo, estado nutricional, perturbação ambiental, entre outros, possam ser analisadas simultaneamente em meio a centenas de metabólitos, fornecendo uma visão mais holística a partir dos dados obtidos (DIXON *et al.*, 2006). A cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas *tandem* (UHPLC-MS/MS) é uma importante ferramenta analítica utilizada no estudo metabolômico, combinando a eficiência e rapidez na separação dos analitos no UHPLC com o alto desempenho do MS. Somado a isso, o analisador de massas do tipo orbitrap fornece alta e reprodutível precisão da massa em combinação com a faixa de massa dinâmica suficiente e velocidade de varredura (NIELSEN, 2015).

Neste contexto, as ferramentas disponíveis de bioinformática são essenciais para a análise adequada do grande número de dados gerados através do uso de instrumentos analíticos (LAZAR *et al.*, 2015). Vários são os bancos de dados de espectros de massas específicos (METLIN, *Human Metabolome DataBase* - HMDB, *LIPID MAPS*, *Massbank Of North America* e outros) que fornecem informações para que comparações possam ser feitas a partir dos dados obtidos e que auxiliam na detecção de moléculas em estudo utilizando-se de métodos estatísticos (MELAMUD *et al.*, 2010). Além dos anteriormente citados, outros bancos de dados de espectros de massas gratuitos permitem que espectros de MS/MS gerados possam ser inseridos em seu banco e seja realizada uma anotação de moléculas seguindo critérios pré-estabelecidos. O GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) enquadra-se como uma plataforma de armazenamento, análise e disseminação de espectros de MS/MS (**Figura 5**). Nesta base de dados, todo conhecimento acerca de espectros brutos que é gerado pela comunidade contribui para ajudar na anotação molecular através da comparação destes com espectros de referência (bibliotecas espectrais) e outros dados experimentais. Além disso, o GNPS permite que sejam realizadas análises de derreplicação de moléculas através da consulta em bibliotecas espectrais próprias e

de terceiros (MassBank, ReSpec e NIST), bem como formação de redes moleculares (*Molecular Networking*, MN) (WANG *et al.*, 2016).

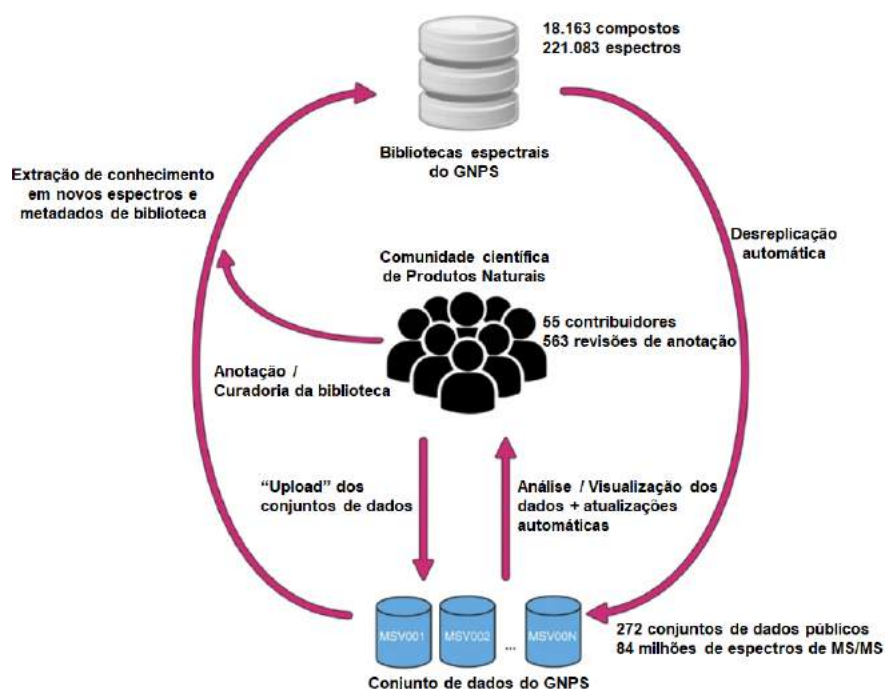


Figura 5. Representação das interações entre a comunidade de produtos naturais, bibliotecas espectrais do GNPS e seus conjuntos de dados. No momento, 221.083 espectros de MS/MS de 18.163 compostos exclusivos são usados para pesquisas no GNPS. Isso inclui bibliotecas de terceiros, como MassBank, ReSpec e NIST, bem como bibliotecas espectrais criadas para o GNPS (GNPS-Collections) e espectros da comunidade NP (GNPS-Community). As bibliotecas espectrais GNPS crescem por meio das novas identificações de espectros MS/MS feitas por usuários. A utilidade dessas bibliotecas é derreplicar compostos, tanto em dados públicos quanto privados. Esse processo de derreplicação é executado em todos os conjuntos de dados públicos e os resultados são relatados automaticamente, permitindo que os usuários consultem todos os conjuntos de dados, organismos e condições. Fonte: Adaptado de WANG *et al.*, 2016.

As redes moleculares clássicas (MNC) são representações visuais dos espectros de fragmentação presentes na amostra. Cada nó da rede molecular formada corresponde a um espectro MS/MS. As linhas entre os nós os conectam de acordo com o grau de similaridade. A formação destas redes (famílias espectrais) pelo GNPS dá-se pela semelhança na fragmentação apresentada pelos analitos, o que é um indicativo de semelhança estrutural entre os mesmos. Esta correlação espectral entre os compostos pode ser realizada mesmo quando não houver a presença de nenhuma anotação pelo banco de dados (WANG *et al.*, 2016).

Complementando a qualidade das informações fornecidas pelos dados obtidos das análises de MS/MS, a ferramenta *Feature-based Molecular Networking* (FBMN) permite a formação das redes moleculares incorporando informações adicionais como padrões de isótopos, tempo de retenção, mobilidade de íons e área do pico correspondente ao sinal de interesse, sendo possível visualizar a distinção entre isômeros que produzam MS/MS semelhantes, facilitando a anotação espectral e fornecendo informações quantitativas. Para tanto, ao contrário do MNC, que utiliza a contagem de íons precursores somados, o FBMN utiliza a área ou altura do pico para realizar uma estimativa mais precisa da intensidade relativa do íon. Para isso, o FBMN requer um pré-processamento dos dados de MS/MS utilizando *softwares* de visualização e otimização de parâmetros (por exemplo, MZmine ou MS-DIAL). Neste processamento podem ser ajustados a intensidade mínima dos picos obtidos em MS e MS/MS, os tempos de retenção e valores de m/z médios (conjunto de informações que definem os *features*), a junção dos isótopos e o alinhamento dos *features* obtidos. Estes *softwares* exportam os dados em formatos específicos para que, através da utilização da plataforma GNPS, seja possível a criação de redes moleculares contendo todas estas informações acerca dos metabólitos presentes nas amostras (NOTHIAS *et al.*, 2020). O resultado da rede molecular é visualizado usando o *software* de bioinformática Cytoscape. A informação quantitativa acerca dos *features* é expressa através do tamanho do nó formado nas redes moleculares (**Figura 6**). Assim como no MNC, os nós são conectados por bordas quando os espectros de fragmentação representativos têm um número de íons de fragmento correspondentes e perfis MS/MS semelhantes sobre um valor de cosseno (*cosine*) limite. O FBMN fornece uma maneira conveniente de investigar totalmente cada um dos metabólitos, acessando seus tempos de retenção, abundância de pico cromatográfico, fórmulas moleculares e propriedades espectrais de MS/MS. Portanto, o FBMN tem sido usado recentemente em um número crescente de relatórios de pesquisa como um método para a investigação abrangente de produtos naturais (NOTHIAS *et al.*, 2020; HOU *et al.*, 2019).

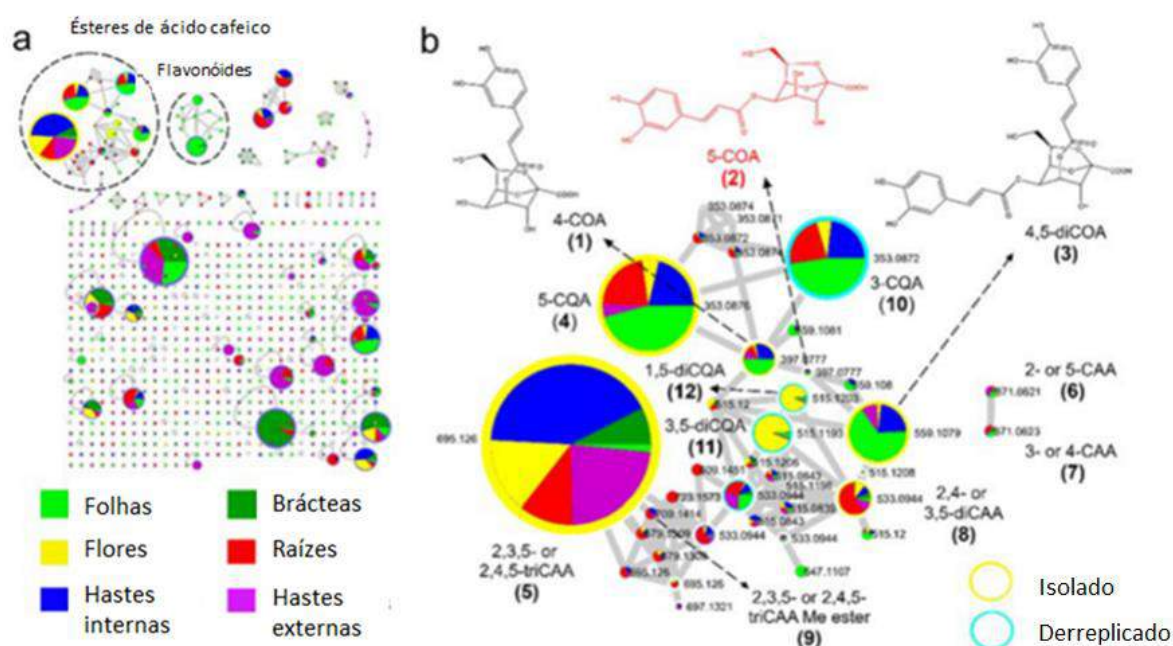


Figura 6. Exemplo de redes moleculares obtidas através do *Feature-based Molecular Networking* através de análises de UHPLC-UV-HRMS/MS, em modo negativo, de diversas partes de plantas de batatas yacon **a**) Rede molecular inteira, indicando que os grupos de ésteres de ácido cafeico representam a maior parte dos nodos formados. O tamanho dos nodos representa diferenças semi-quantitativas nas concentrações dos metabólitos em cada extrato da planta analisada, enquanto que as cores dos nodos estão relacionadas à presença de cada metabólito em diferentes órgãos **b**) Nodos amplificados de ésteres de ácido cafeico e suas identificações de fórmulas estruturais. Nodos circulados em amarelo foram isolados e caracterizados e nodos circulados em azul tiveram sua anotação por derreplicação. FONTE: Adaptado de PADILLA-GONZÁLEZ *et al.* (2020).

Outras ferramentas disponíveis, como o *Network Annotation Propagation* (NAP), o *DEREPLICATOR* e o MS2LDA contribuem para a previsão de espectros de fragmentação *in silico* de estruturas conhecidas permitindo uma pesquisa em bancos de dados químicos para prováveis estruturas postulantes. Tal como em outras ferramentas, aqui a razão massa/carga (m/z) dos precursores bem como os espectros MS/MS servem como entrada para buscar prováveis estruturas correspondentes, as quais são classificadas por uma pontuação associada. O *DEREPLICATOR* é orientado à busca de peptídeos (MOHIMANI *et al.*, 2016) enquanto o NAP utiliza de anotações (*matches*) já previamente feitas em redes moleculares para sugerir possíveis estruturas candidatas vizinhas a estas (SILVA *et al.*, 2018). Já o MS2LDA faz a busca de subestruturas das moléculas baseando-se

não somente em seus íons fragmentos, mas também em perdas neutras comuns, contribuindo assim para anotações de subfamílias e modificações compartilhadas (HOOFT *et al.*, 2016). Adicionalmente, o *MolNetEnhancer* (ferramenta também disponível na plataforma do GNPS) é capaz de agregar as informações fornecidas pelas ferramentas anteriores fornecendo os dados em forma de redes moleculares (Figura 7). Ademais, com base nos dados sintetizados, ele fornece referências das famílias espectrais formadas, como classes e subclasses químicas às quais pertencem (ERNST *et al.*, 2019). As redes moleculares aqui formadas também podem ser exploradas com a utilização do Cytoscape.

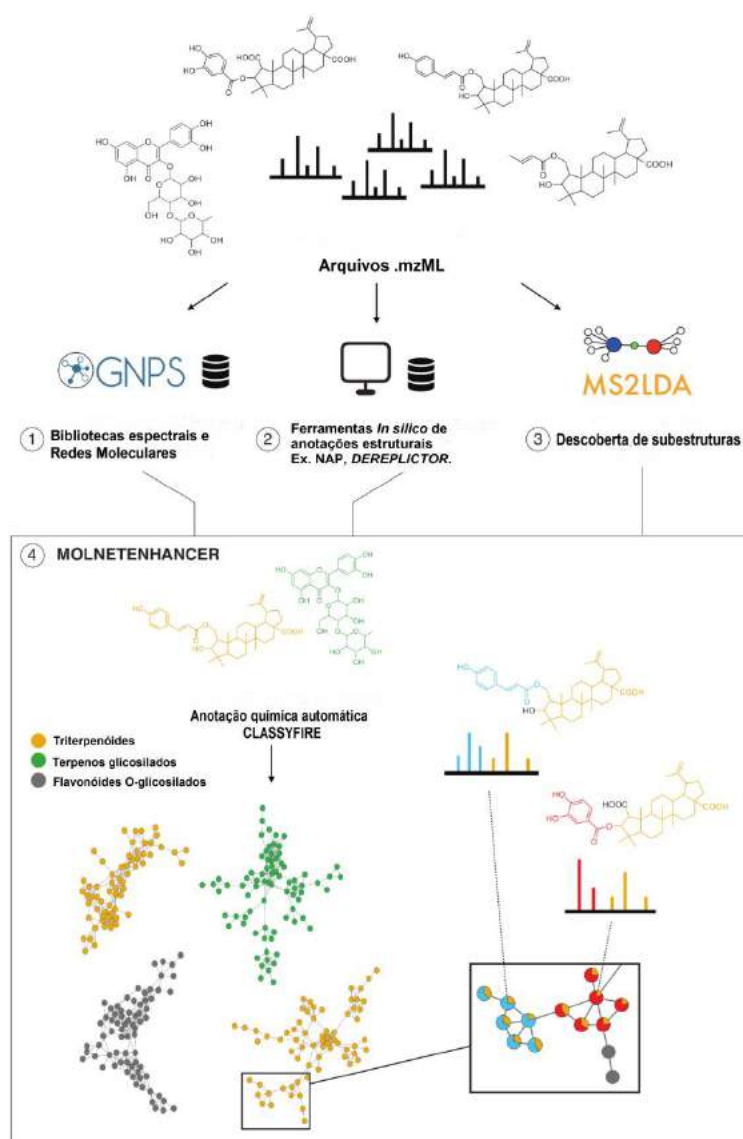


Figura 7. Visão esquemática global da formação das redes moleculares na ferramenta *MolNetEnhancer*. Fonte: Adaptado de ERNST *et al.*, 2019.

1.5 Níveis de Anotação e Identificação

O trabalho de caracterização dos metabólitos presentes em amostras de estudo é uma das metas da metabolômica. O conjunto de dados obtidos através da utilização de uma ou mais técnicas analíticas permite-nos fazer inferências acerca da composição e estrutura de metabólitos presentes no material analisado. Para tanto, uma distinção a dois termos torna-se necessária: anotação e identificação. A anotação de um metabólito é uma atribuição putativa do mesmo e é realizada baseando-se na correspondência de suas características físico-químicas (massa nominal, tempo de retenção, espectro de fragmentação etc.) com dados presentes em bases de dados públicas ou comerciais. A identificação é feita através da comparação das propriedades utilizando-se um padrão autêntico em condições analíticas idênticas às do metabólito em questão (GODZIEN *et al.*, 2018). Entretanto, diferentes níveis de anotação dos metabólitos podem ser obtidos. A classificação determinada pelo *Chemical Analysis Work Group* (CAWG), que é parte do *Metabolomics Standards Initiative* (MSI) (SUMNER *et al.*, 2007; FIEHN *et al.*, 2007) é dividida em 5 níveis (**Figura 8**). Os níveis de anotação 0 e 1 são considerados como níveis de identificação dos compostos. O nível 0 trata do metabólito que foi devidamente isolado e teve toda sua estereoquímica completamente caracterizada. O nível 1 trata da identificação do composto mediante a comparação de suas propriedades físico-químicas com um padrão autêntico. O nível 2 caracteriza a anotação de compostos mediante a similaridade de suas propriedades físico-químicas com dados presentes em bibliotecas espectrais públicas ou comerciais. O nível 3 trata de compostos os quais tiveram suas classes químicas anotadas mediante, também, suas propriedades físico-químicas ou similaridade espectral quando comparada a compostos químicos conhecidos de uma determinada classe química. O nível 4 trata de compostos que não foram nem identificados nem anotados, entretanto, baseado nas informações obtidas acerca destes, podem ser diferenciados e quantificados (GODZIEN *et al.*, 2018).

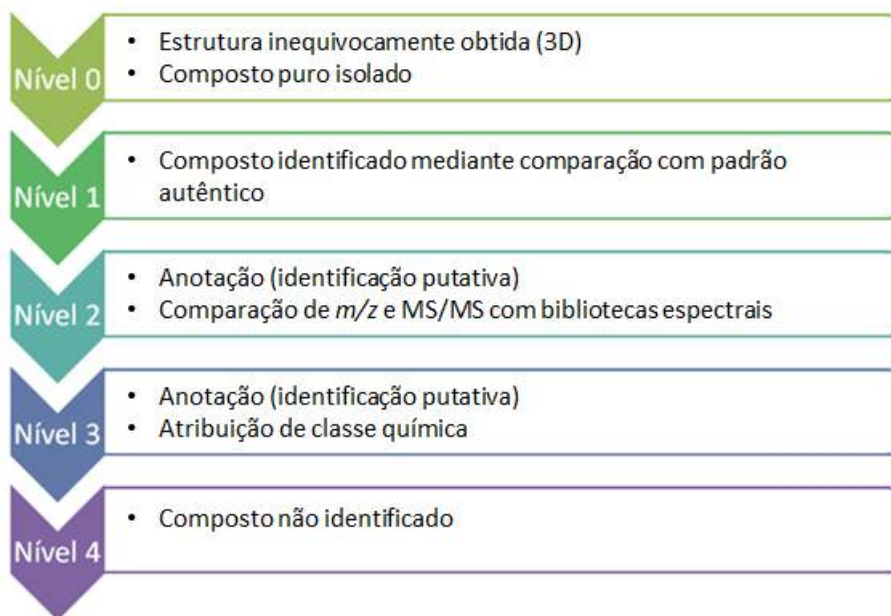


Figura 8. Níveis de confiança na identificação de compostos para estudos de metabolômica.

Fonte: Adaptado de GODZIEN *et al.*, 2018.

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal avaliar o perfil metabólico do biofertilizante Vorax[®], sendo o mesmo obtido a partir da fermentação da bactéria *C. glutamicum* em melaço de cana de açúcar e sais minerais, por meio da caracterização química durante os diferentes períodos de produção do biofertilizante, associando a ensaios biológicos de sub-frações do mesmo.

2.1 Objetivos Específicos

Dentre os objetivos específicos encontram-se:

- Analisar os extratos gerados a partir do cultivo da bactéria *C. glutamicum* em meio de cultura composto de melaço de cana e sais minerais através de análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Para tanto, buscou-se examinar cada uma das etapas que compõem o processo produtivo do biofertilizante;
- Realizar anotações de metabólitos secundários de interesse produzidos pela bactéria *C. glutamicum*;
- Entender o papel dos metabólitos primários e secundários presentes no biofertilizante que possam estar relacionados ao aumento de produtividade de culturas agrícolas;
- Avaliar as respostas apresentadas por plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijão) submetidas ao tratamento com soluções do biofertilizante e frações obtidas do produto via análises de biomassa;
- Investigar o efeito do biofertilizante na germinação de sementes de *P. vulgaris* mediante análises de biomassa.

3. Materiais e Procedimentos

As amostras do biofertilizante Vorax[®], pertencentes ao lote 125/18, e amostras dos períodos que compõem o processo produtivo do mesmo, pertencentes ao lote 150/19, foram fornecidas pela empresa Microquímica Indústrias Químicas Ltda.

3.1 Investigação do perfil metabólico do biofertilizante Vorax[®]

Extrações líquido-líquido com o biofertilizante Vorax[®] foram realizadas utilizando 4 solventes de diferentes polaridades: hexano, diclorometano, butanol (Synth, Diadema/SP) e acetato de etila (planta piloto – IQ/UNICAMP). Todas as extrações foram realizadas na proporção de 2/1 (v/v) (solvente/biofertilizante). Os materiais foram centrifugados por 3 min a 5000 rpm, os sobrenadantes separados e concentrados em N₂ gasoso. Cada extração teve seu concentrado obtido ressuspenso em 1 mL metanol grau HPLC (Synth). Posteriormente, 100 µL de cada solução obtida foi diluída em 900 µL de metanol grau HPLC (Synth) e filtrada para vials utilizando membrana hidrofóbica PTFE (Analítica, São Paulo/SP) de 0,22 µm de diâmetro de poro para posterior análise via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

As análises foram realizadas no Laboratório de Biomoléculas e Espectrometria de Massas da Universidade Estadual de Maringá (Maringá/PR) utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Nexera X2, Japão) acoplado a espectrômetro de massas com analisador quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF) (Impact II, Bruker Daltonics Corporation, Alemanha). Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna C18 Acquity UPLC CSM (2,1µm; 2,1 x 100 mm) (Waters, EUA) e a composição da fase móvel foi de água suplementada com 1% (v/v) de ácido fórmico (A) e metanol com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (B), à 40°C. A vazão de fase móvel foi de 0,2 mL.min⁻¹. As análises foram realizadas no modo positivo com fonte de ionização *electrospray* (ESI) compreendendo a faixa *m/z* 50-1400. Os quatro íons mais intensos foram selecionados para fragmentação automática. A energia de colisão utilizada foi de 3,5 kV. Espectros foram processados no *software DataAnalysis 4.2* (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha).

3.2 Análises dos períodos de produção do biofertilizante Vorax®

A produção do biofertilizante Vorax® é realizada no sistema de operação descontínua (batelada) e o procedimento é dividido em “períodos”. Estes períodos constituintes do processo produtivo são descritos na **Figura 9**. Triplicatas de extrações líquido-líquido de amostras referentes a cada período foram realizadas tal como descrito na seção 3.1, entretanto, utilizando apenas o solvente acetato de etila.

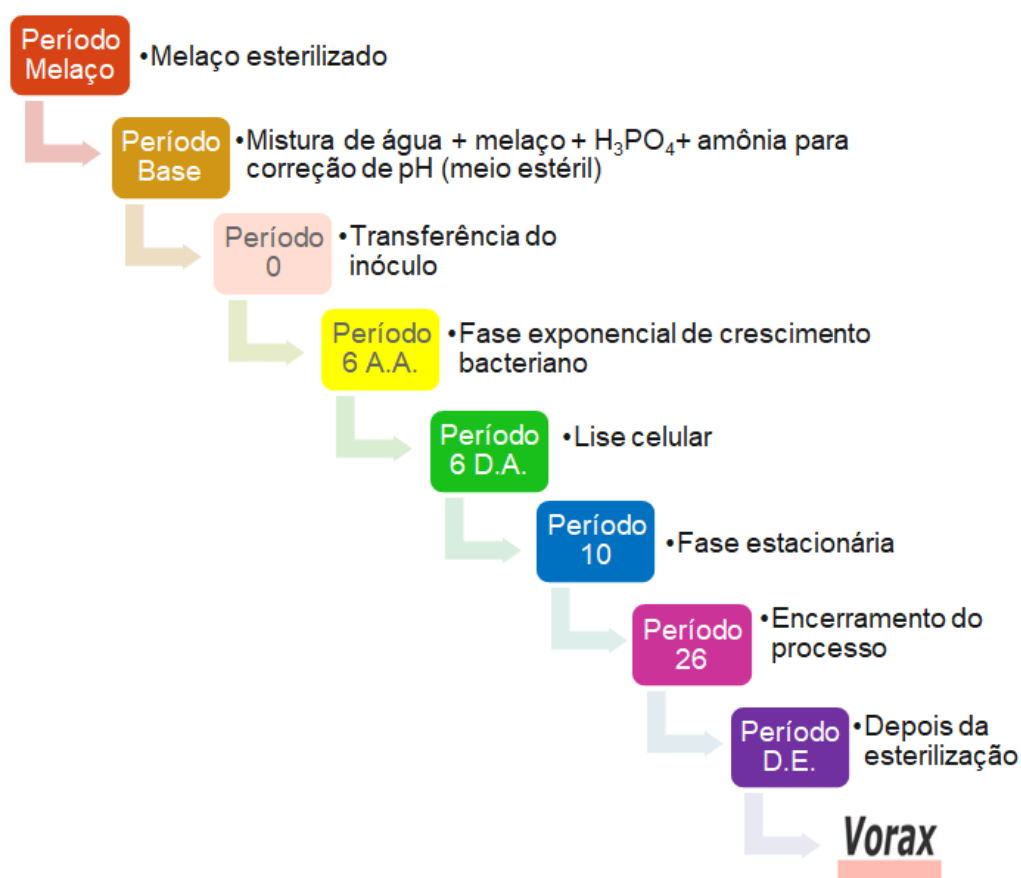


Figura 9. Etapas que compõem o processo produtivo do biofertilizante. Maiores informações acerca do processo não podem ser informadas por sigilo industrial.

Uma nova extração líquido-líquido do biofertilizante (em duplicata) com acetato de etila foi realizada seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente no item 3.1.

As análises foram realizadas na empresa Apex Science (Campinas/SP) utilizando equipamento HPLC (UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas Orbitrap de alta resolução (Q Exactive, Thermo Fisher Scientific, EUA) com fonte de ionização *electrospray* a 3,5 kV. Para a

separação cromatográfica foi utilizada uma coluna Thermo Scientific Accucore C18 (2,6 μm ; 100 x 2,1 mm). A composição da fase móvel foi de água suplementada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B). A corrida cromatográfica procedeu-se de forma gradiente, sendo, para a análise dos períodos de produção: 0-10 min 5% B, 10-15min 5% a 98% B, 15-16,2 min 98% a 5% B e 16,2- 25 min 5% B, sendo mantidos à 45°C, com vazão da fase móvel de 0,2 mL.min⁻¹ e 3 μL de volume total de injeção. Para a análise do biofertilizante Vorax: 0-10 min 5% B, 10-17min 5% a 98% B, 17-25 min 98% a 5% B, sendo mantidos a 45°C, com vazão da fase móvel de 0,3 mL.min⁻¹ e 4 μL de volume total de injeção. As análises foram realizadas em modo positivo compreendendo a faixa m/z 133-2000 na análise dos períodos de produção e m/z 100-1500 para o biofertilizante. Em ambas as análises os cinco íons mais intensos por ciclo foram selecionados para fragmentação automática. Os espectros foram processados no *software Xcalibur 3.0.63* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.3 Extração em larga escala e obtenção de frações do biofertilizante Vorax®

Realizou-se uma extração líquido-líquido em larga escala partindo de 20L do biofertilizante utilizando-se acetato de etila na proporção de 2/1 (v/v) (solvente/biofertilizante). O extrato obtido foi submetido a uma purificação parcial utilizando gel Sephadex® LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia) e metanol grau HPLC (Synth) como solvente eluente. Ao final do procedimento, um total de 60 frações foi obtido.

Com o intuito de reduzir a quantidade de frações totais do produto foi avaliado o perfil cromatográfico destas, utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Acquity UPLC, Waters, EUA) acoplado a um detector de arranjo de diodos com detector de UV (PDA), para detecção de compostos que apresentassem absorção em comprimentos de onda $\lambda = 210 \text{ nm}$. Para a separação cromatográfica, utilizou-se uma coluna analítica C18 Zorbax Eclipse Phenyl-Hexyl (5 μm ; 150 x 4,6 mm). A composição da fase móvel foi de água suplementada com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (A) e acetonitrila (B), vazão da fase móvel de 1,0 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 10 μL . A corrida cromatográfica procedeu-se de forma gradiente: 0-20 min 5% B, 20-22 min 50% B, 22-25 min 5% B. Os espectros foram processados com o *software Empower 2* (Waters, EUA). As 60 frações inicialmente obtidas foram agrupadas de acordo com a semelhança entre os perfis cromatográficos reduzindo,

assim, para um total de 6 frações. A **Figura 10** ilustra os passos realizados para o procedimento.



Figura 10. Esquema ilustrativo dos passos utilizados na extração em larga escala do biofertilizante para obtenção de frações do mesmo. O concentrado do biofertilizante obtido após a extração líquido-líquido foi submetido a uma purificação parcial. As 60 frações obtidas após a purificação foram analisadas em um HPLC-DAD e, finalmente, agrupadas em 6 frações de acordo com seu perfil espectral.

Amostras das frações obtidas foram submetidas à análise de HPLC-MS/MS na empresa Apex Science, utilizando um UHPLC (UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas Orbitrap de alta resolução (Q Exactive, Thermo Fisher Scientific, EUA) com fonte de ionização *electrospray* a 3,5 kV. Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna Thermo Scientific Accucore C18 (2,6 μm ; 100 x 2,1 mm). A composição da fase móvel foi de água suplementada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B). A corrida cromatográfica procedeu-se de forma gradiente: 0-10 min 5% B, 10-15min 5% a 98% B, 15-16,2 min 98% a 5% B e 16,2- 20 min 5% B, sendo mantidos à 45°C. A vazão da fase móvel foi de 0,2 mL.min⁻¹ e 3 μL de volume total de injeção. As análises foram realizadas em modo positivo compreendendo a faixa m/z 100-1500. Os cinco íons mais intensos foram selecionados para fragmentação automática. Os espectros foram processados no *software Xcalibur 3.0.63* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.4 Utilização das Ferramentas de Bioinformática

3.4.1 Library Search

Os dados do biofertilizante obtidos através da análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas descrito no item 3.2 foram comparados aos espectros MS/MS presentes no banco de dados da plataforma GNPS. Para tanto, os dados em formato .raw foram convertidos para o formato .mzXML utilizando o *software* MSConvert (ProteoWizard Software Foundation, EUA). Após convertidos os dados foram submetidos à nuvem do banco de dados do GNPS para realização das pesquisas. Buscou-se por compostos já caracterizados no *Molecular Library Search* (<http://gnps.ucsd.edu>) com tolerância da massa do íon precursor e do íon do fragmento MS/MS ajustadas para 0.02 Da de modo a gerar espectros consensos. Compostos identificados putativamente deveriam ter um cosseno (*cosine score*) igual ou superior a 0.75 e pelo menos 4 fragmentos semelhantes. Espectros fornecidos foram confrontados com espectros presentes em bases de dados do GNPS para estabelecer os *hits* (anotações estabelecidas pela plataforma), sendo que estes também deveriam possuir um cosseno igual ou superior a 0,75 e pelo menos 4 fragmentos idênticos (WANG *et al.*, 2016). Quanto mais próximo de 1 mais semelhantes são as moléculas obtidas nos dados brutos e aquelas fornecidas pelas bases de dados. Foi também realizada a verificação manual dos espectros de fragmentação de íons com as bibliotecas espectrais em bases de dados virtuais, tais como HMDB, *MassBank of North America* dentre outros.

3.4.2 Feature-based Molecular Networking

Foram construídas redes moleculares utilizando os dados obtidos após as análises HPLC-MS/MS dos períodos de produção do biofertilizante (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/featurebasedmolecularnetworking/>). Para a construção das redes moleculares através do FBMN foi necessário um processamento dos dados no *software* MZmine 2.53. Após a importação dos arquivos em formato de arquivo .mzXML para o software, realizou-se visualização nos dados brutos para verificar a intensidade de variações na linha de base, tempo de duração do pico e número mínimo de pontos necessário para formar um pico cromatográfico e poder selecionar os parâmetros para as etapas de processamento

posteriores. Na sequência, algumas funções foram utilizadas. Os nomes das mesmas, suas finalidades e os parâmetros utilizados são mostrados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Parâmetros utilizados no *software* MZmine para a construção de tabelas de quantificação e, posteriormente, redes moleculares através do *MolNet Enhancer*.

Função	Finalidade	Parâmetros Utilizados
<i>Mass Detection</i>	Detecção de massas/sinais em MS e MS/MS	MS: 1×10^5 MS/MS: 1×10^3
<i>ADAP Chromatogram Builder</i>	Construção dos cromatogramas	<i>Group intensity threshold</i> : 3×10^5 <i>Minimum group size</i> : 5 <i>Minimum highest intensity</i> : 3×10^5 <i>m/z tolerance</i> : 10 ppm
<i>Chromatogram Deconvolution</i>	Deconvolução dos cromatogramas dos íons extraídos em picos individuais	<i>Local minimum search</i> <i>Chromatogram threshold</i> 10% <i>Search min. RT</i> : 0.01 <i>Min. absolute height</i> : 3×10^5 <i>Min. ratio peak top/edge</i> : 2 <i>Peak duration range</i> : 0.05 – 2.00 <i>m/z range for MS/MS</i> : 0.01 <i>RT range for MS/MS</i> : 0.02
<i>Isotopes Peak Grouper</i>	Agrupamento de isótopos	<i>m/z tolerance</i> : 10 ppm <i>RT tolerance</i> : 0.02 <i>Min. charge</i> : 2 <i>Representative isotope</i> : most intense
<i>Alignment</i>	Alinhamento dos sinais/picos selecionados para ajuste de variações no tempo de retenção	<i>Join aligner</i> <i>m/z tolerance</i> : 10 ppm <i>Weight for m/z</i> : 75 <i>RT tolerance</i> : 0.05 <i>Weight for RT</i> : 25

Como última etapa, foi realizada uma verificação manual dos dados gerados a fim de filtrar sinais cromatográficos sem definição ou àqueles que fossem detectados apenas em amostras do branco do solvente.

Os dados processados contendo os *features* detectados foram exportados como tabela (formato de arquivo .csv) para a plataforma GNPS em para construção das redes moleculares via FBMN. Para a construção destas redes moleculares foi considerada uma tolerância de massa do íon precursor e dos íons fragmentos MS/MS de 0.02 Da. As conexões entre os nós foram formadas de tal forma que o cosseno (*cosine score*) apresentasse um valor superior a 0.75 e um

número mínimo de 4 picos em comum no espectro de fragmentação (WANG *et al.*, 2016; NOTHIAS *et al.*, 2020).

3.4.3 Network Annotation Propagation

Para a obtenção das anotações por propagação entre as redes moleculares obtidas (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/nap/>) foram utilizados os respectivos resultados dos trabalhos (*GNPS job ID*) para cada uma das redes formadas via FBMN (períodos de produção, produto final e frações). A precisão da massa para a busca de candidatos foi definida para 5 ppm e o valor do mínimo do cosseno para sub selecionar dentro de um cluster ficou estabelecido como 0.65. Foram selecionadas as bases de dados de estruturas químicas GNPS, NPatlas (<https://www.npatlas.org/>), SUPNAT (http://bioinf-applied.charite.de/supernatural_new/), CHEBI (<https://www.ebi.ac.uk/chebi/>), DRUGBANK (<https://go.drugbank.com/>) e FooDB (<https://foodb.ca/>) para a busca de possíveis metabólitos compatíveis com os valores de massa do íon precursor e dos íons fragmento.

3.4.4 MolNetEnhancer

Para aprimorar as informações estruturais químicas na rede molecular, as anotações de estrutura *in silico* do NAP e as informações obtidas através das análises via FBMN foram incorporadas à rede usando o fluxo de trabalho GNPS *MolNetEnhancer* (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/molnetenhancer/>) no site do GNPS. As anotações da classe química foram realizadas usando a ontologia química ClassyFire (ERNST *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2016; FEUNANG *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018).

3.5 Ensaios *in vivo*

3.5.1 Ensaios de germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris*

Testes de germinação com sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. - Var. Pérola) foram realizados utilizando soluções do biofertilizante Vorax® e soluções preparadas a partir das 6 frações obtidas conforme descrito na seção 3.3. As sementes foram adquiridas da empresa Sementes Fortaleza (Campinas/SP) e são pertencentes ao lote FP 01/20. Os graus de pureza e germinação informados pelo

forneecedor são iguais a 99,6% e 90%, respectivamente. Utilizou-se duas folhas de papel para germinação (Cienlab Equipamentos Científicos Ltda., Campinas/SP) como substrato e estes foram previamente cortados e autoclavados antes de serem colocados em placas de Petri (8,5 cm de diâmetro). Foram adicionadas 6 sementes e um total de 6 mL de cada uma das soluções teste em cada placa, sendo estas posteriormente vedadas com Parafilm M[®]. As placas foram mantidas em câmara de fotoperíodo sob sistema 12h/12h claro/escuro e sob temperatura de 27°C, por 7 dias. Os testes foram realizados em duplicata (exceto para o controle negativo) e a concentração utilizada para as soluções foi igual a 300 ppm, conforme recomendação do fabricante. Para o controle positivo foi utilizado água Milli-Q[®] e para o controle negativo, foi utilizado uma solução de glifosato a 1% (m/m). Para comparação dos resultados foram avaliados dados de formação de biomassa, como o comprimento e a massa das raízes formadas. A **Figura 11** ilustra os passos realizados no experimento.



Figura 11. Esquema ilustrativo para realização dos ensaios de germinação de sementes utilizando as soluções do biofertilizante e das frações deste.

3.5.2 Ensaios de aplicação foliar em plantas de *Phaseolus vulgaris*

Testes de aplicação foliar foram realizados utilizando soluções do biofertilizante Vorax[®] e soluções preparadas a partir das 6 frações obtidas conforme descrito na seção 3.3. Os ensaios foram realizados entre 05 de janeiro e 01 de fevereiro de 2021 em casa de vegetação, no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, com variância de temperatura entre 21-37°C, umidade 23-93%, irrigação periódica controlada de 2 mm e iluminação natural. Para o crescimento das plantas utilizou-se vasos de 8 litros e sementes do lote descrito na seção 3.5.1. Foi utilizado, também, substrato para hortaliças (casca de pinus, turfa, vermiculita, superfosfato simples e nitrato de potássio) adquirido da empresa Vida

Verde (Mogi Mirim/SP). Os vasos foram irrigados com 2 litros de solução concentrada de 1,8% de nitrogênio, 1,8% de fósforo, 7,2% de potássio, 0,05% de ferro (EDTA) e 0,002% de molibdênio minutos antes da semeadura. Foram semeadas 4 sementes por vaso. Como descrito na **Tabela 2**, o ensaio foi composto por 8 tratamentos, sendo cada tratamento consistindo em 4 vasos, totalizando 16 plantas por tratamento. Sete dias após a germinação foram aplicados 25 mL de cada solução para cada um dos 8 tratamentos, sendo aplicação única. A concentração utilizada para cada solução foi igual a 300 ppm. A avaliação dos resultados obtidos para os 8 tratamentos foi realizada 14 dias após a aplicação das soluções e esta deu-se pela análise da biomassa fresca e seca das raízes e da parte aérea. A quantidade de clorofilas totais foi avaliada utilizando-se o equipamento Clorofilog® (Falker – Porto Alegre/RS). Todas as análises deram-se pela comparação de cada tratamento com o controle positivo (apenas aplicação de água). A secagem das raízes e partes aéreas foi realizada em estufa, a 50 °C, por 72 h, como proposto por Milani *et al.* (2008), com adaptações.

Tabela 2: Descrição das soluções utilizadas para cada tratamento no ensaio de aplicação foliar em *Phaseolus vulgaris*.

Tratamento	Solução Aplicada
1	Água (controle positivo)
2	Vorax
3	Fração 1
4	Fração 2
5	Fração 3
6	Fração 4
7	Fração 5
8	Fração 6

3.6 Análises estatísticas

3.6.1 Análises estatísticas multivariadas das análises de UHPLC-MS/MS dos períodos de produção do biofertilizante Vorax®

Os dados brutos de LC-MS/MS, obtidos para os períodos de produção do biofertilizante (item 3.2), foram convertidos para formato de arquivo .mzXML

utilizando o *software* MSConvert (ProteoWizard Software Foundation) e processados no *software* MZmine, como descrito no item 3.4.2. O *software* gera uma matriz de dados onde estão descritas informações referentes a cada *feature* reconhecido (MS, tempo de retenção e área do pico correspondente), e a informação de cada *feature* é relacionada a um número de reconhecimento (ID). Com a matriz gerada, foi utilizada a plataforma online *MetaboAnalyst 4.0* a fim de analisar as mudanças geradas no perfil metabólico pela análise de PCA (*Principal Component Analysis*) e PLS-DA (*Partial least squares discriminant analysis*). Os dados foram previamente normalizados pela mediana, transformados logaritmicamente e escalonados por Pareto.

3.6.2 Análises estatísticas univariadas das análises *in vivo* com *Phaseolus vulgaris*

As análises estatísticas univariadas relativas aos ensaios *in vivo* com as sementes e as plantas de *P. vulgaris* foram realizadas utilizando o Action Stat 4.0 (EstatCamp - Software e Soluções Estatísticas - São Carlos/SP). Testes de Shapiro-Wilk foram usados para verificar a normalidade de distribuição dos dados, enquanto que o Teste de Levene foi aplicado para verificação da homogeneidade das variâncias. Utilizou-se os Testes T-student e Wilcoxon-Mann-Whitney, com níveis de significância de 95% em todos os casos, para amostras paramétricas e não paramétricas, respectivamente. O *Microsoft Excel* (Microsoft Corporation, EUA) foi utilizado para a construção dos gráficos de diagrama de caixa (*boxplot*) a fim de ilustrar a distribuição dos valores obtidos.

3.7 Testes antifúngicos de soluções do biofertilizante Vorax® frente aos fungos *Fusarium graminearum* e *Penicillium digitatum*

Para realizar a avaliação de uma possível capacidade de ação antifúngica do biofertilizante Vorax® foram preparados meios de cultura para o cultivo dos fungos *Fusarium graminearum* e *Penicillium digitatum* utilizando-se os meios Czapek e YES (yeast extract sucrose), respectivamente, conforme descrito por Kosalec *et al.* (2005). Suspensões de esporos de cada fungo na concentração de 10^5 esporos mL⁻¹ foram preparadas para serem utilizadas em testes de Concentração Mínima Inibitória (*Minimum Inhibitory Concentration* - MIC). Estes testes de inibição foram realizados com o biofertilizante Vorax® em concentrações próximas a de aplicação

(300 ppm). O procedimento foi realizado tal como descrito por Wiegand *et al.* (2008), com modificações.

3.8 Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa do biofertilizante Vorax®

Com a finalidade de avaliar o potencial sobre a proliferação de células humanas, foi realizado o teste de atividade antiproliferativa do biofertilizante Vorax®. O teste foi realizado em parceria com pesquisadores do Laboratório de Fitoquímica, Farmacologia e Toxicologia experimental (LAFTex), da Faculdade de Ciência Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas seguindo protocolo descrito por Monks (1991) e Shoemaker (2006), com adaptações. A linhagem celular HaCat (queratinócitos humanos imortalizados) foi cedida pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP. As células foram mantidas em meio RPMI 1640 (Nutricell, Campinas, SP) suplementado com 5% de soro fetal bovino (VitroCell, Campinas, SP), denominado como meio de cultivo completo. Para os experimentos, o meio de cultivo completo foi suplementado com 1% de uma solução de *streptomycin/penicillin* (1000 U.mL⁻¹:1000 µg. mL⁻¹, 1%, VitroCell). Tanto para manutenção quanto para o experimento, as células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Inicialmente, as células HaCat (100 µL.compartimento⁻¹, 3 X 10⁴ cel.mL⁻¹) foram plaqueadas em 2 placas de 96 compartimentos denominadas T1 (tratadas) e T0 (controle de células no início do experimento, 6 compartimentos) e incubadas por 24 horas. Após este período, as células das placas T1 foram expostas a soluções do biofertilizante preparadas em meio de cultivo completo (100 µL.compartimento⁻¹, 0,15, 1,5, 15 e 150 µL.mL⁻¹), ao controle positivo de atividade antiproliferativa Doxorubicina (Eurofarma, 100 µL.compartimento⁻¹, 0,015, 0,15, 1,5 e 15 µL.mL⁻¹) ou meio de cultivo completo (100 µL.compartimento⁻¹). Após os tratamentos, as células da placa T1 foram incubadas por 48 horas enquanto as células da placa T0 foram fixadas com ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich, 50%, 50 µL.compartimento⁻¹) por 1 hora, a 4°C, para determinação da quantidade celular inicial. Após as 48 horas de exposição, as células da placa T1 foram fixadas com ácido tricloro acético. Após secagem em temperatura ambiente, todas as células fixadas (T1 e T0) foram coradas com solução de sulforrodamina B 0,4% em ácido acético 1% (50 µL.compartimento⁻¹) por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a lavagem do excesso de corante com ácido acético 1% e secagem das placas, o corante ligado

às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (10 μ M, pH 10,5, 150 μ L.compartimento⁻¹) e foi realizada a leitura espectrofotométrica das microplacas em comprimento de onda a 540 nm no espectrofotômetro VersaMax (Molecular Devices, EUA).

A proliferação celular (%) foi considerando-se a diferença entre os valores de absorbância das células viáveis sem tratamento ao final (T1) e no início (T0) do período de exposição como representativas de 100% de proliferação celular.

As curvas de proliferação celular em função da concentração da amostra foram construídas empregando-se o *software* ORIGIN 8.0 (OriginLab Corporation).

4. Resultados e Discussão

4.1 Investigação do perfil metabólico do biofertilizante Vorax®

Devido à complexidade da matriz do biofertilizante, buscou-se realizar extrações com diferentes solventes para explorar classes distintas de metabólitos presentes na amostra. Diferentes interações entre os solventes utilizados e o biofertilizante foram verificadas durante as extrações. Nesta análise exploratória do biofertilizante foram anotados 72 metabólitos através do *Molecular Library Search* da base de dados GNPS, compreendendo fitormônios, compostos fenólicos, ácidos orgânicos dentre outros. Dentre os metabólitos, 30 correspondem à extração com o solvente acetato de etila (41,67% do total das anotações), 23 ao diclorometano (31,94% das detecções totais), 20 à extração com hexano (27,78%) e 34 metabólitos (47,22%) utilizando-se *n*-butanol. A distribuição do total de metabólitos obtidos em cada extração é representada no diagrama de Venn da **Figura 12**.

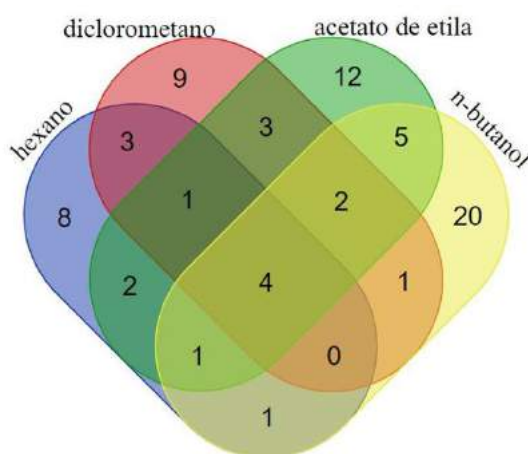


Figura 12. Diagrama de Venn mostrando a distribuição dos metabólitos identificados putativamente pela base de dados GNPS através da extração do biofertilizante Vorax® com os solventes citados, utilizando um HPLC-MS/MS, no modo positivo.

As classes de metabólitos que foram detectadas através das extrações com os solventes acetato de etila e *n*-butanol apresentaram alguma similaridade. Desta maneira, para as etapas seguintes, optou-se em prosseguir com extrações utilizando apenas o acetato de etila devido a maior facilidade em obter extratos secos com este solvente e, também, devido ao menor custo médio deste solvente em relação ao *n*-butanol.

4.2 Anotação de metabólitos presentes no biofertilizante

O uso de biofertilizantes é capaz de auxiliar no aumento da produção agrícola (CAJAMARCA *et al.*, 2019; SCHÜTZ *et al.*, 2018; ANSARI *et al.*, 2014), no entanto, devido ao grande número de possíveis matérias-primas disponíveis para a elaboração destes produtos, uma análise composicional faz-se necessária a fim de garantir a segurança no manuseio e aplicação dos mesmos.

As técnicas de espectrometria de massas têm sido utilizadas há mais de meio século com o intuito de ajudar a identificar compostos desconhecidos (KIND *et al.*, 2007). Por este motivo, a técnica de UHPLC-MS/MS foi aplicada a fim de investigar o perfil metabólico do biofertilizante obtido através da fermentação da bactéria *C. glutamicum* em melaço de cana-de-açúcar.

Resultados das análises composicionais dos extratos de Vorax[®], obtidos através da extração líquido/líquido com acetato de etila, foram alcançados com o auxílio da base de dados *Global Natural Products Social Molecular Network* (GNPS) através da utilização do *Library Search*, que permite realizar a derreplicação dos dados brutos de MS/MS comparando com dados das bibliotecas espectrais da plataforma para estabelecer os *hits*. A comparação é baseada na similaridade do cosseno (*cosine score*) obtido, que quanto mais próximo de 1 é o resultado, mais similar ao espectro da biblioteca. Os principais metabólitos anotados selecionados estão exibidos na Tabela 3, sendo alguns brevemente discutidos de acordo com informações encontradas na literatura.

De acordo com os resultados obtidos, diversos metabólitos de diferentes classes químicas foram anotados. Dentre estes, algumas classes de compostos já conhecidos e reportados por apresentarem bioatividade em plantas, como fitormônios (CUTLER *et al.* 2010; HLUSKA *et al.*, 2021; TAMOGAMI *et al.*, 1997), lipídios (PROST *et al.*, 2005), compostos fenólicos (SHARMA *et al.*, 2019) e aminoácidos (AZIZ *et al.*, 2017; FRANZONI *et al.*, 2021).

O íon *m/z* 281.2484, presente nas amostras dos extratos do biofertilizante no tempo de retenção 8.20 min (**Figura 13a**), foi anotado pela plataforma GNPS como sendo o ácido linoleico ($[M+H]^+$, $C_{18}H_{33}O_2$). Para a realização da anotação, os dados de MS/MS obtidos para o íon precursor foram comparados com as bibliotecas espectrais presentes na plataforma. O *mirror match* (**Figura 13b**) fornecido pela plataforma mostra os íons fragmentos do metabólito anotado em comparação com a

biblioteca e é utilizado para efetivar a anotação espectral. Nele, os dados brutos obtidos através das análises de UHPLC-MS/MS são mostrados na parte superior (em preto) e são comparados com os resultados fornecidos (em verde) pela plataforma GNPS. A comparação entre os espectros de MS/MS apresentou um *cosine score* de similaridade de 0.96.

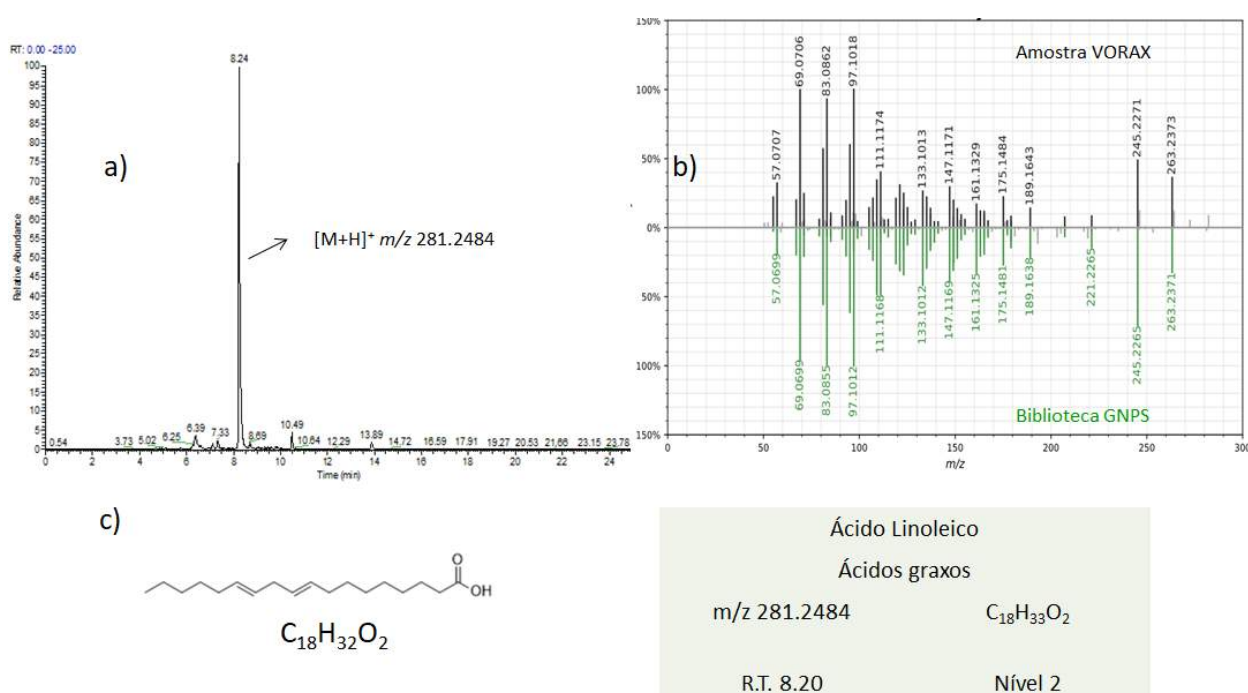


Figura 13. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+ m/z 281.2484$, com detecção para o metabólito ácido linoleico, no tempo de retenção 8.20 min. **b)** Mirror Match do GNPS para o íon $[M+H]^+ m/z 281.2484$, com anotação para o ácido linoleico. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. **c)** Fórmula estrutural e molecular do ácido linoleico.

De maneira geral, sabe-se que os lipídios têm função estrutural e de armazenamento de carbono em sistemas vegetais (NELSON e COX, 2011). Em específico, os oxilipídios são uma diversa classe de ácidos graxos oxigenados (GÖBEL *et al.*, 2009) que estão envolvidos em respostas antimicrobianas (PROST *et al.*, 2005) e de defesa contra condições de estresses bióticos e abióticos (BÄRENSTRAUCH *et al.*, 2020; MAYNARD *et al.*, 2018). A síntese destes compostos, em plantas, deve-se a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados como, por exemplo, o ácido linoleico e o ácido linolênico.

O íon m/z 279.2327, presente no tempo de retenção 8.04 min (**Figura 14a**), foi anotado como sendo o ácido linolênico ($[M+H]^+$, $C_{18}H_{30}O_2$). O *mirror match* obtido para o referido íon, com *cosine score* de similaridade igual a 0,76, é mostrado na **Figura 14b**.

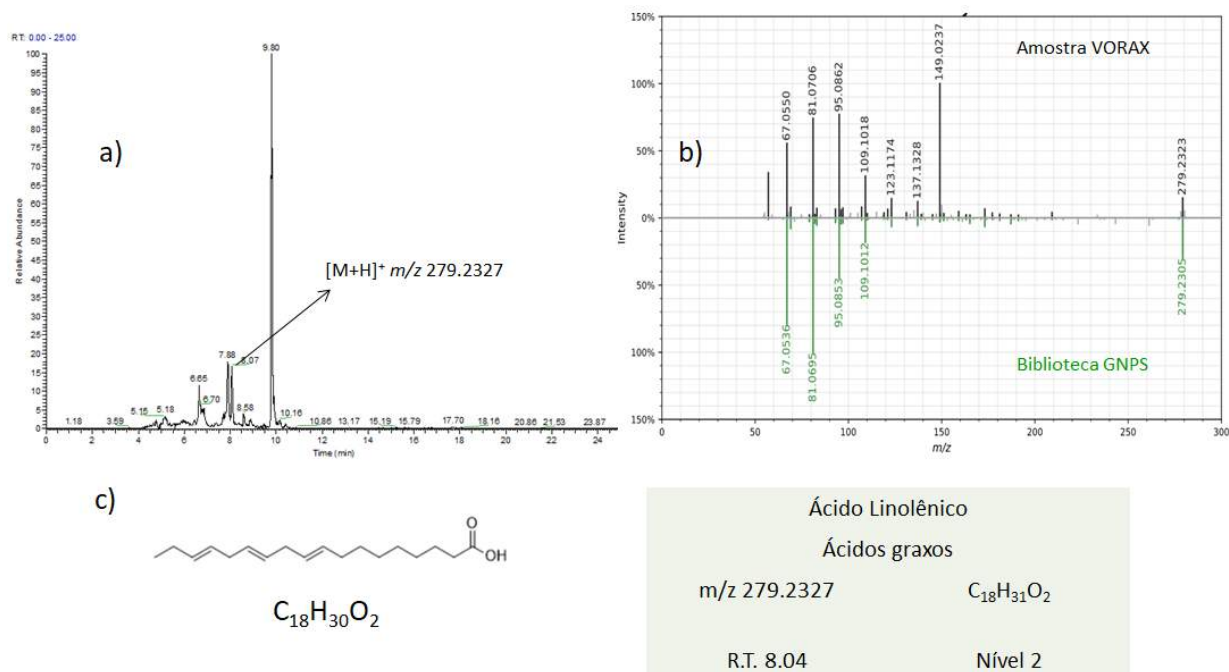


Figura 14. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 279.2327, com detecção para o metabólito ácido linolênico, no tempo de retenção 8.04 min. **b)** *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 281.2484, com anotação para o ácido linoleico. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. **c)** Fórmula estrutural e molecular do ácido linolênico.

Como supracitado, os ácidos graxos poli-insaturados linoleico e linolênico são precursores de oxilipídios e, também, são precursores do ácido jasmônico, uma importante molécula sinalizadora nas respostas das plantas a resistência a insetos e patógenos (CREELMAN e MULLET, 1997).

A anotação sugerida para o composto de m/z 247.1330 ($[M+H-H_2O]^+$, $C_{15}H_{19}O_3$), no tempo de retenção 4.13 min, proposto pela base de dados foi o ácido abscísico (**Figura 15a**). Para a anotação realizada foram utilizados os íons fragmentos do íon m/z 247.1329 pela plataforma GNPS conforme visto no *mirror match* (*cosine score* de similaridade de 0.88) na **Figura 15b**.

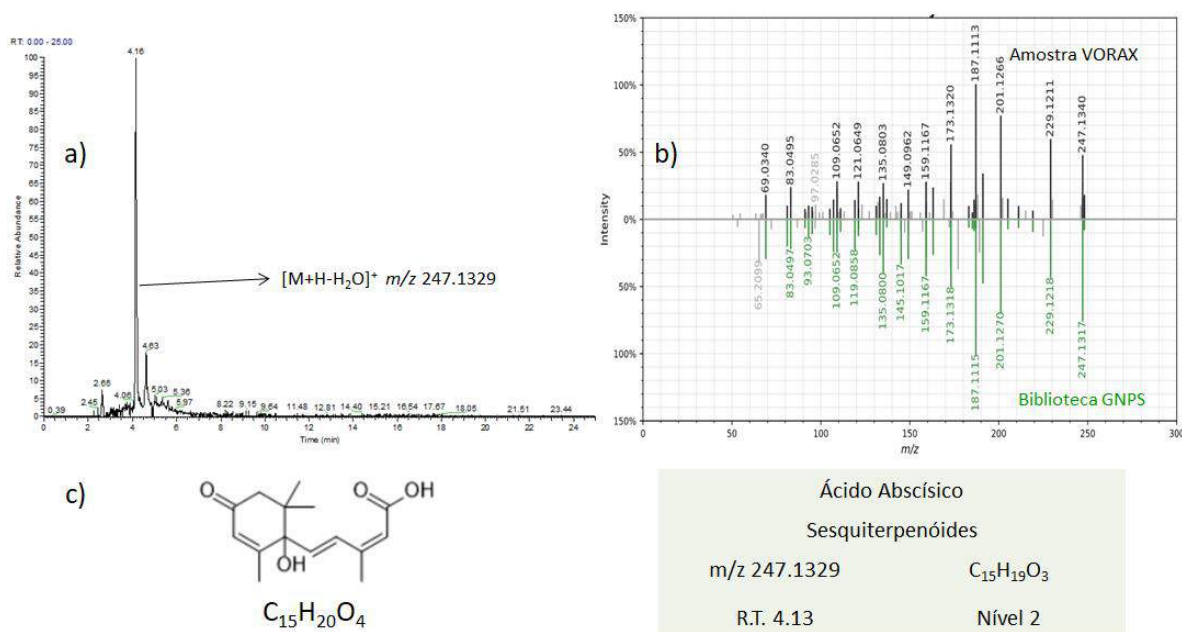


Figura 15. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H-H_2O]^+$ m/z 247.1329, com detecção para o metabólito ácido abscísico, no tempo de retenção 4.13 min. **b)** Mirror Match do GNPS para o íon $[M+H-H_2O]^+$ m/z 247.1329, com anotação para o ácido abscísico. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. **c)** Fórmula estrutural e molecular do ácido abscísico.

Porcel *et al.* (2014) descreve em seu trabalho que, assim como outros fitormônios, o ácido abscísico é um sesquiterpenóide natural e está envolvido em processos fisiológicos das plantas, tais como sinalizador a estresses abióticos, como a falta de água, além de estarem envolvidos na regulação do crescimento e desenvolvimento. Foi visto, também, que este composto pode inibir o alongamento das raízes apresentando, assim, uma correlação negativa entre crescimento e o conteúdo endógeno das plantas. No entanto, plantas deficientes em ABA são geralmente menores do que as selvagens. Bano *et al.* (2012) propuseram a aplicação exógena de ABA para melhorar a tolerância ao estresse.

Tratando-se de fitormônio, uma anotação obtida para o íon m/z 204.1244, presente no tempo de retenção 2.63 min (**Figura 16a**), foi para a citocinina N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina ($[M+H]^+$, $C_{10}H_{14}N_5$). O *cosine score* de similaridade para o *mirror match* obtido para este metabólito (**Figura 16b**) foi de 0.97.

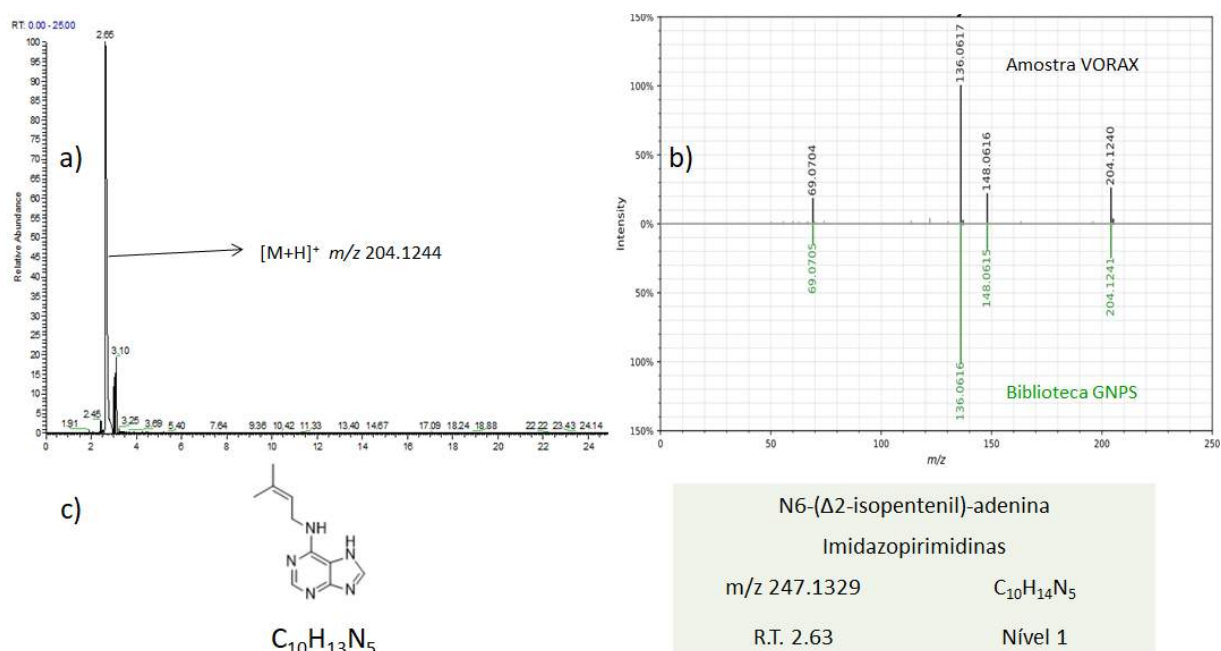


Figura 16. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 204.1244, com detecção para o metabólito N6-(Δ2-isopentenil)-adenina, no tempo de retenção 2.63 min. **b)** Mirror Match do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 204.1244, com anotação para a N6-(Δ2-isopentenil)-adenina. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. **c)** Fórmula estrutural e molecular da N6-(Δ2-isopentenil)-adenina.

As citocininas naturais são fitormônios derivados de adenina e que possuem uma cadeia lateral aromática ou então um isoprenóide, como é o caso da N6-(Δ2-isopentenil)-adenina. Estes fitormônios estão envolvidos em uma série de processos fundamentais às plantas associados à produtividade, como estresses bióticos e abióticos (CORTLEVEN *et al.*, 2019), formação de calos (LALOUE *et al.*, 1977), desenvolvimento de raízes e brotos (WERNER *et al.*, 2003) e na indução de resistência à patógenos (AKHTAR *et al.*, 2020; NASEEM *et al.*, 2014). Outras características importantes da ação das citocininas são o retardamento da senescência das folhas (HÖNIG *et al.*, 2018; GUO *et al.*, 2014) e seu papel na biossíntese de clorofila (MÜLLER *et al.*, 2021; CORTLEVEN *et al.*, 2014). Além disso, um estudo de Hlophe *et al.* (2021) mostrou que plantas *Brachystelma pulchellum* e *B. pygmaeum* tiveram seus teores de compostos fenólicos aumentados após cultivo *in vitro* na presença de 3 citocininas, sendo que a N6-(Δ2-isopentenil)-adenina apresentou os maiores níveis de elevação daqueles compostos.

Para o íon m/z 204.1244, a fragmentação observada e utilizada para estabelecer o *hit* com a citocinina N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina pode ser observada pelo *mirror match*, mostrado na **Figura 17b**. A confirmação da presença deste composto no biofertilizante Vorax[®] foi realizada comparando o perfil de fragmentação obtido nas análises do biofertilizante com a análise utilizando o padrão comercial (Sigma-Aldrich), fornecido pela empresa Microquímica Indústrias Químicas Ltda. Observa-se nas análises o mesmo tempo de retenção em 2.63 min., como mostrado na **Figura 17c** e, com base nesta comparação pode-se anotar a citocinina com nível de anotação 1, ou seja, quando há a comparação com o padrão autêntico.

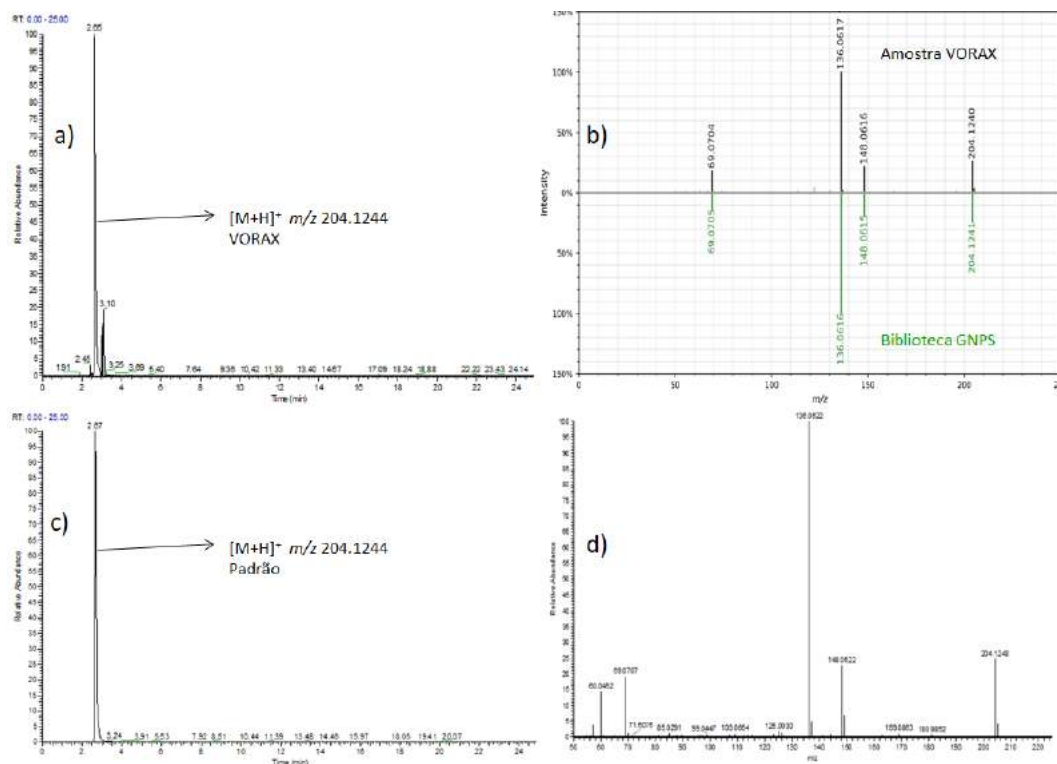


Figura 17. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 204.1244, com anotação para o metabólito N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina, no tempo de retenção 2.63 min, para o extrato do biofertilizante. **b)** *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 204.1244, com anotação para a N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. **c)** Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 204.1244 do padrão de N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina (Sigma-Aldrich), no tempo de retenção 2.62 min. **d)** Fragmentação MS/MS obtida para o padrão da citocinina N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina, obtida no tempo de retenção 2.62 min. Observa-se a compatibilidade entre as fragmentações obtidas para a detecção obtida pela plataforma GNPS para o pico base m/z 136.0621 e para os picos obtidos de menor intensidade m/z 148.0616 e m/z 69.0704.

A anotação feita pela plataforma GNPS para o íon m/z 148.0606, no tempo de retenção 0.75 min (**Figura 18a**), foi o aminoácido ácido glutâmico ($[M+H]^+$, $C_5H_{10}NO_4$). Como mencionado na seção 1.2, sabe-se que este aminoácido encontra-se presente na composição geral do biofertilizante e, assim, sua detecção já era esperada. A comparação dos íons fragmentos obtidos para os dados brutos foi realizada com resultados presentes nas bibliotecas espectrais do GNPS e o

resultado é mostrado na **Figura 18b**, onde é apresentado o *mirror match* (cosine score de similaridade de 0.80) fornecido pela plataforma.

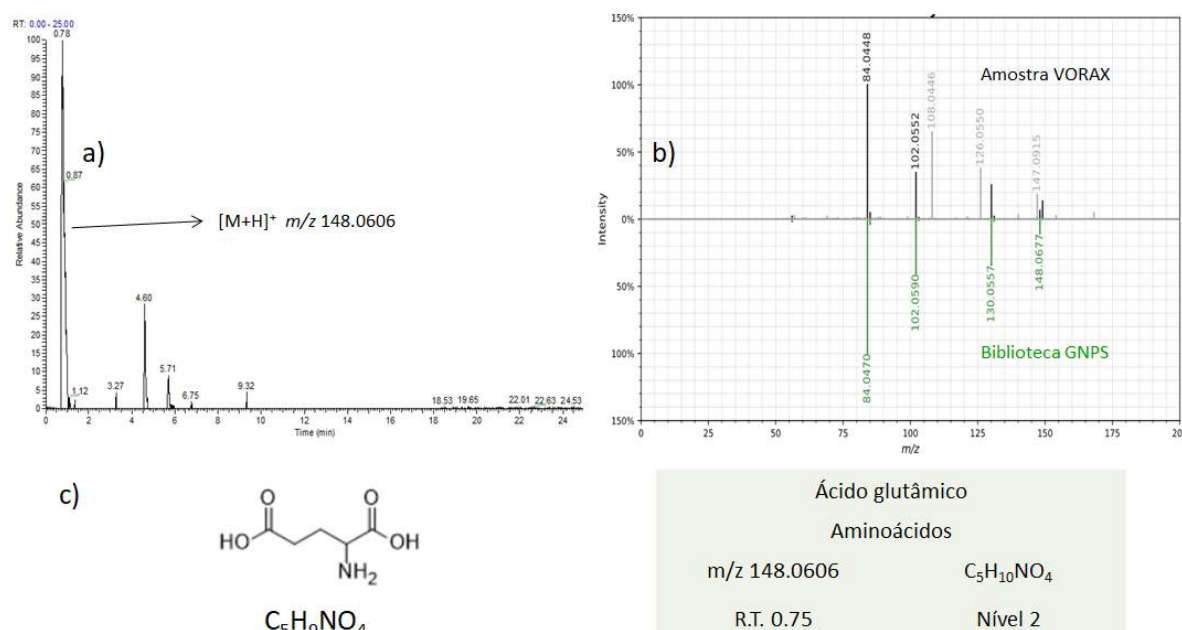


Figura 18. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+ m/z 148.0606$, com detecção para o metabólito ácido glutâmico, em 0.75 min. **b)** *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+ m/z 148.0606$. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. **c)** Fórmula estrutural e molecular do ácido glutâmico.

Aminoácidos são compostos nitrogenados que constituem as unidades fundamentais para a síntese de proteínas. O ácido glutâmico é precursor de muitos compostos orgânicos (BROSAN *et al.*, 2012), sendo um precursor da síntese de clorofila nas plantas (TAIZ *et al.*, 2017). Qiu *et al.* (2020) traz uma ampla discussão em seu artigo de revisão acerca de outras importantes funções desempenhadas por este aminoácido. Lee *et al.* (2021) descreve em seu trabalho os efeitos benéficos no aumento da eficiência fotossintética e atividade antioxidativa em plantas de tomate submetidas a aplicações exógenas de ácido glutâmico. Similarmente, El-Rheem *et al.* (2021), Mazher *et al.* (2011) descrevem ganhos em biomassa advindos da aplicação foliar de soluções utilizando o composto. Ampofo e Ngadi (2021) apresentam resultados de aumentos em compostos fenólicos em plantas de feijão

submetidas a aplicações de ácido glutâmico correlacionando com redução no estresse oxidativo das plantas.

Foram anotados três compostos fenólicos nos tempos de retenção 2.58, 3.07 e 2.37 min. (**Figuras 19a, 20a e 21a**) para os íons m/z 199.0608, m/z 165.0547 e m/z 161.0598 sendo, respectivamente, o ácido sirínico ($[M+H]^+$, $C_9H_{11}O_5$), o ácido *p*-cumárico ($[M+H]^+$, $C_9H_9O_3$) e a 6-metil cumarina ($[M+H]^+$, $C_{10}H_9O_2$). As informações contendo os íons fragmentos obtidos das análises MS/MS dos compostos fenólicos mencionados e que foram utilizados para comparação com dados presentes nas bibliotecas espectrais da plataforma GNPS são exibidos nos *mirrors matches* (**Figuras 19b, 20b e 21b**). Os respectivos *cosine score* de similaridade para os metabólitos são 0.97, 0.88 e 0.71.

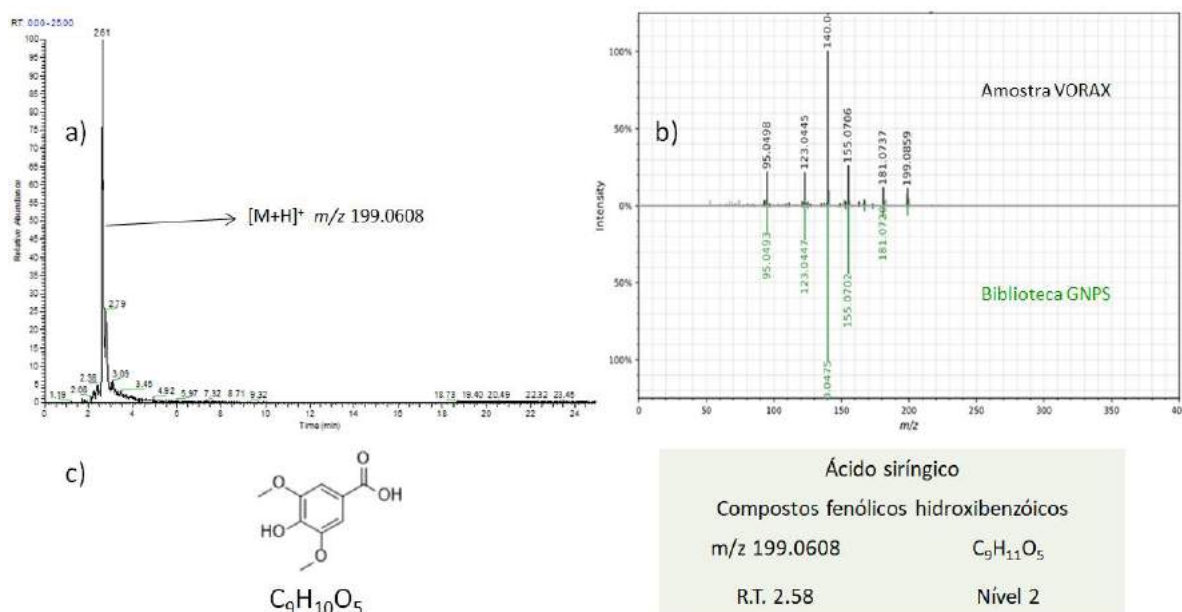


Figura 19. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 199.0608, com detecção para o metabólito ácido sirínico, em 2.58 min. **b)** *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 199.0608. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. **c)** Fórmula estrutural e molecular do ácido sirínico.

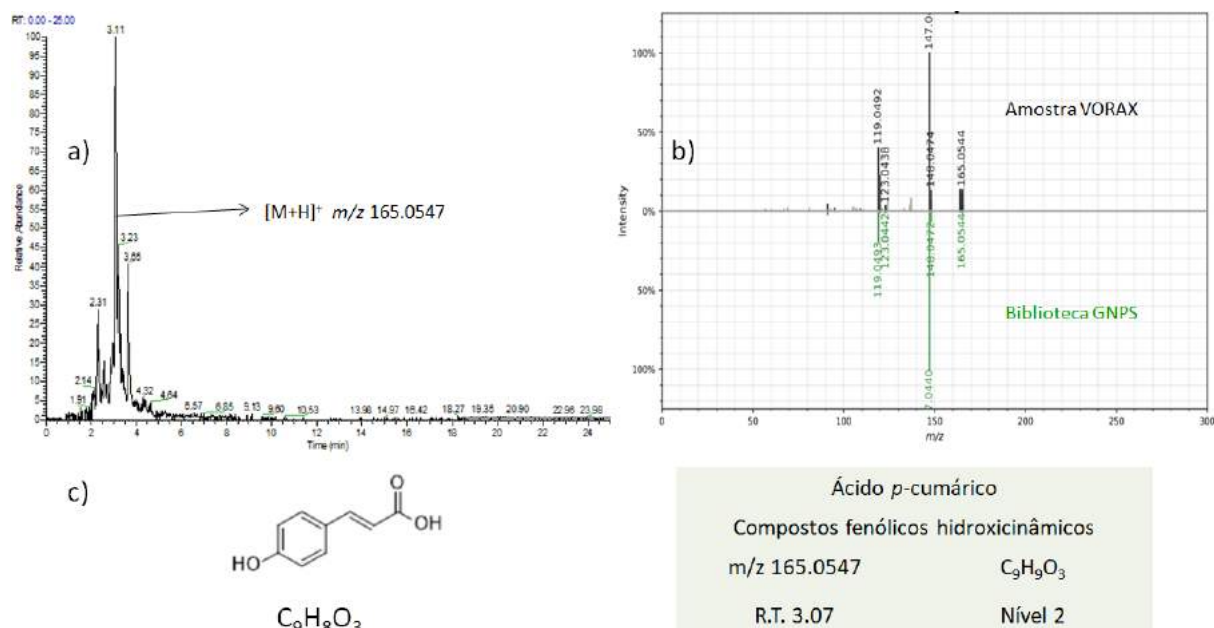


Figura 20. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 165.0547, com detecção para o metabólito ácido *p*-cumárico, em 3.07 min. **b)** Mirror Match do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 165.0547. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. **c)** Fórmula estrutural e molecular do ácido *p*-cumárico.

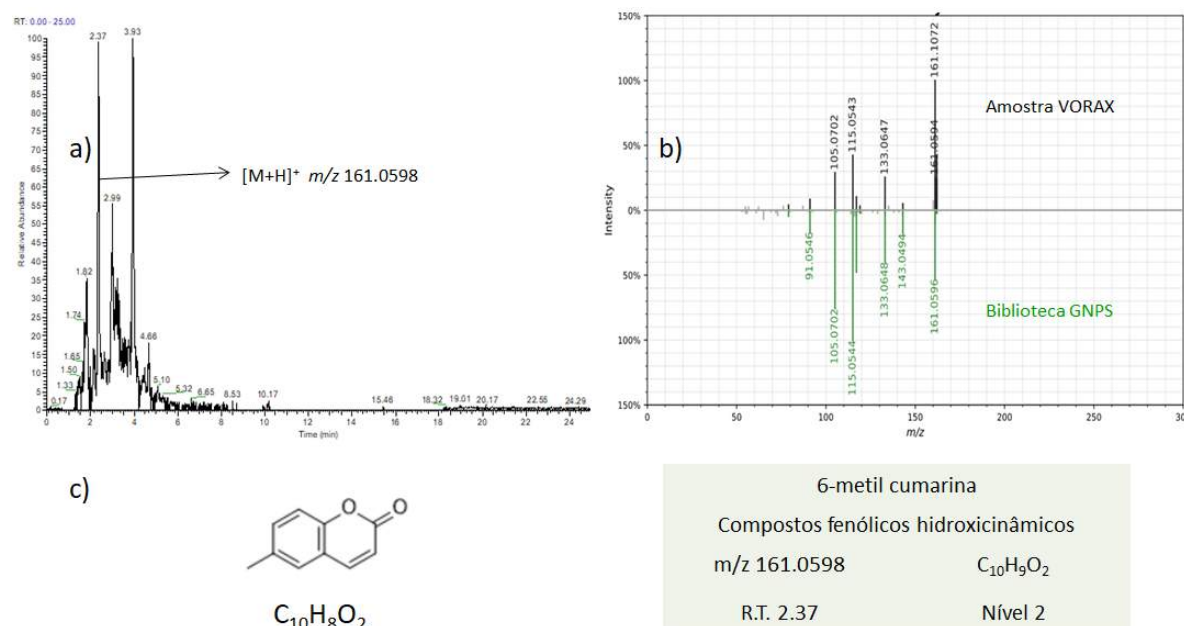


Figura 21. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+ m/z 161.0598$, com detecção para o metabólito 6-metil cumarina, em 2.37 min. **b)** *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+ m/z 161.0598$. De acordo com critérios pré-estabelecidos, a plataforma consegue anotar um determinado metabólito a partir dos íons fragmentos gerados por este. Os valores de MS/MS do metabólito, marcados em preto, podem ser comparados com o seu respectivo *hit* proposto pela plataforma, em verde. **c)** Fórmula estrutural e molecular da 6-metil cumarina.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas e são divididos em hidroxibenzóicos, no qual pertence o primeiro composto, e em hidroxicinâmicos, no qual os dois últimos fazem parte. Os compostos fenólicos de plantas são sintetizados na rota do chiquimato, sendo precursores dos fenilpropanóides e desempenham importantes papéis nas plantas sendo associados às funções de regulação de crescimento e defesa (SHAHIDI e YEO, 2018; NKOMO *et al.*, 2019; BAYOUMI *et al.*, 2008; CHEYNIER *et al.*, 2013). Além disso, eles apresentam ações no organismo humano, como atividade anti-oxidativa e antimicrobiana (NATELLA *et al.*, 1999; SHAHIDI e YEO, 2018; ANGELINI *et al.*, 2021).

Demais metabólitos anotados e listados na **Tabela 3** têm seus dados de cromatogramas de íons extraídos, tempos de retenção, *mirror match* e níveis de anotação apresentados na seção 7 A (Apêndice). Dentre eles encontram-se metabólitos descritos na literatura, como o loliolide (GRABARCZYK *et al.*, 2015; MURATA *et al.*, 2019), 2'-deoxiadenosina (YUAN *et al.*, 2013), jasmonoil-leucina

(WASTERNACK, 2007; TAMOGAMI *et al.*, 1997), linoleoil etanolamida (KEEREETAWEEP *et al.*, 2015), piridoxina (CZÉGÉNY *et al.*, 2019; SOLTANI *et al.*, 2012), N-(2-feniletil)acetamida (REHMAN *et al.*, 2018), N-(1-hidróxi-3-fenilpropan-2-il)benzamida (HUSSAIN *et al.*, 2016), swertisina (CHRZAŚCZ *et al.*, 2021). Além disso, foram anotados 3 metabólitos glicosilados isolados de fontes vegetais: 2-ciclohexen-1-ona-4-[(1)-3-(β -D-glicopiranosiloxi)-1-buten-1-il]-4-hidroxi-3,5,5-trimetil (MORCOL *et al.*, 2020), 2-(hidroximetil)-6-[5-[3-(hidroximetil)-5-(3-hidroxipropil)-7-metoxi-2,3-diidro-1-benzofuran-2il]-2-metoxifenoxi]oxano-3,4,5-triol (KHAN *et al.*, 2020) e (2,3,4,5,6)-2-[4-[(3,3a,6,6a)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrofuro[3,4-c]furan-6-il]-2,6-dimetoxifenoxi]-6-(hidroximetil)oxano-3,4,5-triol (SU *et al.*, 2021).

Tabela 3: Metabólitos putativamente identificados no biofertilizante Vorax®.

	Metabólito	Fórmula Molecular (experimental)	Fórmula Molecular (Teórico)	Aduto	m/z experimental	m/z teórico	Erro (ppm)	Nível de Anotação
1	Ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	[M+H] ⁺	281.2484	281.2475	3.18	2
2	Ácido 13-ceto-9,11-octadecadienóico	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	[M+H] ⁺	295.2269	295.2268	0.44	2
3	Ácido linolênico	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M+H] ⁺	279.2327	279.2319	3.02	
4	Ácido abscísico	C ₁₅ H ₁₉ O ₃	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	247.1329	247.1329	0.12	2
5	N6-(Δ ² -isopentenil)-adenina	C ₁₀ H ₁₄ N ₅	C ₁₀ H ₁₃ N ₅	[M+H] ⁺	204.1245	204.1244	0.63	1
6	Jasmonoil-leucina	C ₁₈ H ₃₀ NO ₄	C ₁₈ H ₂₉ NO ₄	[M+H] ⁺	324.2170	324.2169	0.20	2
7	Ácido <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₉ O ₃	C ₉ H ₈ O ₃	[M+H] ⁺	165.0547	165.0546	0.48	2
8	Ácido siríngico	C ₉ H ₁₁ O ₅	C ₉ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	199.0608	199.0601	3.52	2
9	6-metil cumarina	C ₁₀ H ₉ O ₂	C ₁₀ H ₈ O ₂	[M+H] ⁺	161.0598	161.0597	0.58	2
10	Ácido glutâmico	C ₅ H ₁₀ NO ₄	C ₅ H ₉ NO ₄	[M+H] ⁺	148.0606	148.0604	1.12	2
11	N-(2-feniletil)acetamida	C ₁₀ H ₁₄ NO	C ₁₀ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺	164.1071	164.1070	0.67	2
12	2'-Deoxiadenosina	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₃	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃	[M+H] ⁺	252.1090	252.1091	-0.46	2
13	Linoleiol etanolamida	C ₂₀ H ₃₈ NO ₂	C ₂₀ H ₃₇ NO ₂	[M+H] ⁺	324.2898	324.2897	0.29	2
14	N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)benzamida	C ₁₆ H ₁₈ NO ₂	C ₁₆ H ₁₇ NO ₂	[M+H] ⁺	256.1333	256.1332	0.37	2
15	Piridoxina	C ₈ H ₁₂ NO ₃	C ₈ H ₁₁ NO ₃	[M+H] ⁺	170.0817	170.0812	3.12	2
16	Loliolide	C ₁₁ H ₁₇ O ₃	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	[M+H] ⁺	197.1180	197.1172	3.95	2
17	Swertisina	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₀	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M+H] ⁺	447.1285	447.1286	-0.16	2
18	2-Ciclohexen-1-ona, 4-[(1)-3-(β-D-glicopiranosiloxi)-1-buten-1-il]-4-hidroxi-3,5,5-trimetil	C ₁₉ H ₃₁ O ₈	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	[M+H] ⁺	387.2015	387.2013	0.40	2
19	2-(hidroximetil)-6-[5-[3-(hidroximetil)-5-(3-hidroxipropil)-7-metoxi-2,3-diidro-1-benzofuran-2-il]-2-metoxifenoxi]oxano-3,4,5-triol	C ₂₆ H ₃₈ O ₁₁ N	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	[M+NH ₄] ⁺	540.2441	540.2439	0.30	2

20	(2,3,4,5,6)-2-[4-[(3,3a,6,6a)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrofuro[3,4-c]furan-6-il]-2,6-dimetoxifenoxi]-6-(hidroximetil)oxano-3,4,5-triol	$C_{28}H_{40}O_{13}N$	$C_{28}H_{36}O_{13}$	$[M+NH_4]^+$	598.2493	598.2494	-0.19	2
-----------	---	-----------------------	----------------------	--------------	----------	----------	-------	---

4.3 Análises multivariadas dos períodos de produção do biofertilizante Vorax®

O processo de produção do biofertilizante Vorax® é realizado no sistema de batelada e é dividido 8 em períodos, como descrito na seção 3.2. A fermentação realizada pela *C. glutamicum* ocorre através da utilização do melaço de cana de açúcar como meio de cultivo. Neste sentido, seria esperado encontrar em sua composição, além de metabólitos produzidos pela bactéria, àqueles oriundos de uma matriz vegetal.

Análises estatísticas multivariadas (PCA e PLS-DA) dos dados de UHPLC-MS/MS dos extratos dos períodos de produção do biofertilizante (seção 3.2) foram realizadas e podem ser vistas na **Figura 22**.

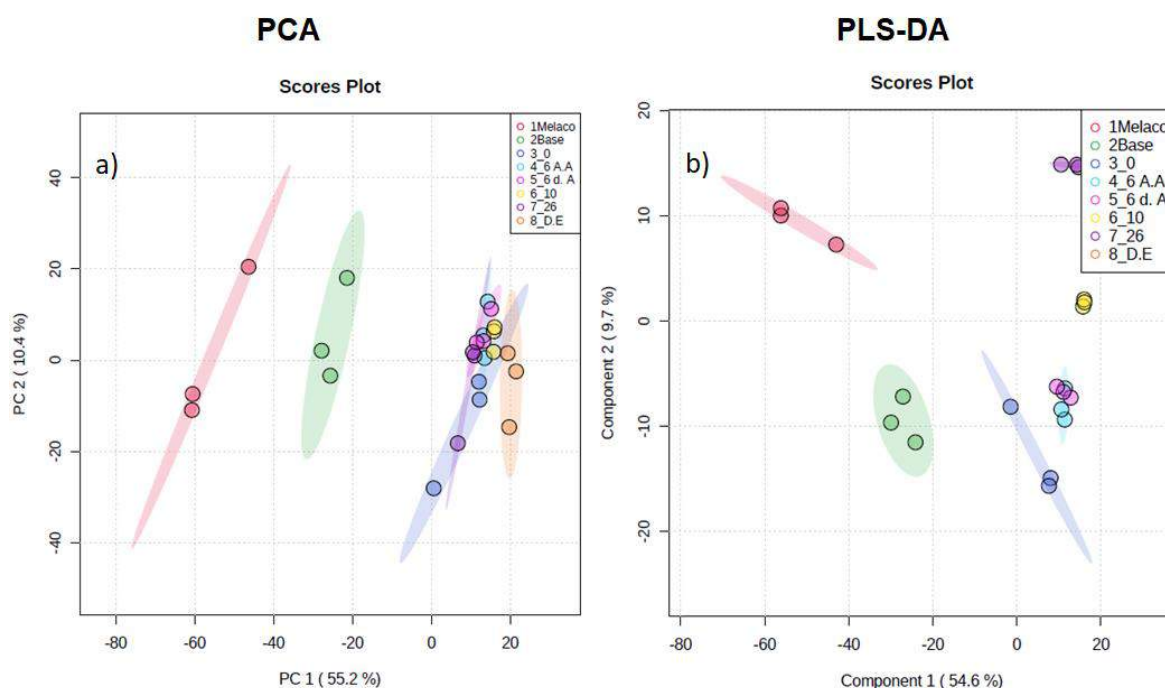


Figura 22. Gráficos de scores 2D referentes ao a) PCA e b) PLS-DA para os dados obtidos através das análises de UHPLC-MS/MS dos períodos de produção do biofertilizante Vorax®.

O PCA (*Principal Component Analysis*) é um método de redução de dados onde estes são projetados em um novo sistema de coordenadas fazendo com que a maior parte da variação dos dados resida nos primeiros componentes principais, os PCs. Em outras palavras, o PCA é mais comumente usado para identificar como uma amostra é diferente de outra, quais variáveis mais contribuem e se essas variáveis contribuem da mesma maneira independentes entre si (XIA e WISHART, 2016). O gráfico de scores na Figura 22a apresenta os dados originais

representados nas novas coordenadas e os *loadings* representam os pesos referentes aos dados originais durante o processo de projeção. A primeira coordenada (PC1) explica 55,2% da variância, enquanto que a segunda coordenada (PC2) explica 10,4%. Como esperado, nota-se uma clara tendência de separação entre os grupos “Melaço” e “Base”, presentes no quadrante negativo de PC1, dos demais grupos, presentes no quadrante positivo de PC1. Isto se deve ao fato de que nestes períodos a bactéria ainda não está presente, sendo esta inoculada no período “0”. Portanto, é sugerido que a bactéria atua de maneira significativa para mudar o perfil do produto final.

O PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) é uma análise supervisionada que usa técnicas de regressão multivariada a fim de extrair, por meio de combinação linear de variáveis originais (X), as informações que podem prever a associação de classe (Y). Em outras palavras, o componente principal preserva o máximo de covariância possível entre o dado original e a informação fornecida ao sistema, presente na matriz Y, de forma a obter o máximo de separação entre os grupos. Assim, o PLS-DA representa uma representação ortogonal do PCA (RUIZ-PEREZ *et al.*, 2020). Para validar o modelo, o teste de permutação foi realizado, por meio da técnica Leave-one-out, obtendo um p-valor de 0.01, com uma análise aleatória utilizando 100 como número de permutação. Além disso, a validação cruzada foi realizada com os dados a fim de verificar a precisão, capacidade de ajuste (R^2) e de predição do modelo (Q^2), respectivamente relacionados à 0.25, 0.99 e 0.95. Esses valores corroboram com a validação do modelo de PLS-DA. O gráfico de *scores* da Figura 24b mostra que a separação entre os grupos foi maior do que o observado para o PCA, sendo este resultado esperado, uma vez que o PLS-DA correlaciona a variância do espaço multidimensional (representado pela matriz X) com uma determinada informação fornecida ao sistema (presente na matriz Y).

As análises realizadas de PCA e PLS-DA forneceram, respectivamente, o *loadings plot* e o VIP (*Variable Importance in Projection*) (**Figura 23**). Ambas as projeções dizem respeito a quais dos *features* mais contribuem para a efetiva separação dos grupos, observados nas Figuras 23a e 23b.

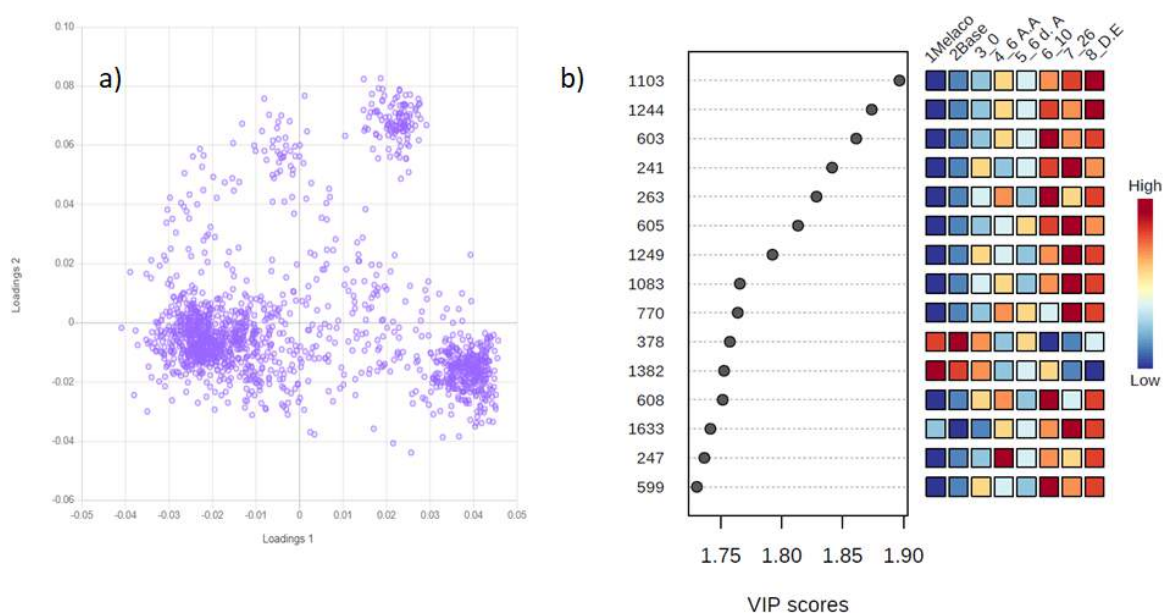


Figura 23. a) *Loadings Plot* onde cada um dos pontos roxos representa um *feature* e **b)** VIP scores obtido ds análise PLS-DA mostrando os ID's dos *features* significativos., ou seja, aqueles que mais contribuem para a separação entre os grupos analisados.

Os dados da Figura 23 auxiliaram na anotação de metabólitos, pois de acordo com cada *feature* diferencial foi possível ver como as classes de compostos químicos que foram anotadas estavam se modificando de acordo com cada período de produção do produto. Dentre os 15 *features* apresentados pelo PLS-DA na tabela de VIP scores, 7 foram anotados a nível 3 e 8 a nível 4 e os mesmos podem ser vistos na seção 7 B (Apêndice).

4.3.1 Redes moleculares dos períodos de produção do biofertilizante e anotações obtidas

A utilização da ferramenta de bioinformática *Feature-based Molecular Networking* auxiliou na quantificação relativa dos metabólitos presentes em cada um dos períodos de produção do biofertilizante. Esta quantificação é baseada na área do pico referente ao *feature*, seja este anotado ou contendo apenas a informação *m/z* do íon. Os nodos formados nas redes (neste caso, cada nodo representando um *feature*) estão coloridos externamente e no círculo central de acordo com a classificação da classe química proposta pelo *MolNet Enhancer*. As cores do anel interno em cada nodo correspondem aos períodos de produção do biofertilizante Vorax®, sendo o espaço ocupado por cada cor proporcional à quantificação relativa daquele íon em cada um dos períodos analisados, como mostrado pelas legendas

nas figuras a seguir. Desta maneira, é possível fazer inferências quanto ao consumo de determinado composto pela *C. glutamicum* ou a sua produção pela mesma. As ferramentas de bioinformática também contribuem para a anotação de compostos seja em nível 2, quando há um *hit* entre os íons precursor e íons fragmentos de um composto presente nos dados analisados com um composto identificado nas bibliotecas espectrais consultadas ou em nível 3, quando os compostos são anotados pelas classes químicas aos quais pertencem por similaridade espectral quando comparada a dados presentes nas bibliotecas espectrais (ou bibliotecas *in silico*, no caso do NAP). A **Figura 24a** mostra a anotação das redes moleculares formadas por suas superclasses químicas (FEUNANG *et al.*, 2016) através de análise *in silico*, usando a ferramenta *MolNet Enhancer*, como descrito no item 3.4. A **Figura 24b** mostra a composição percentual de cada uma das superclasses que foram anotadas. Superclasses como lipídeos, benzenóides, ácidos orgânicos e derivados podem ser observadas nos dados dos períodos de produção do biofertilizante.

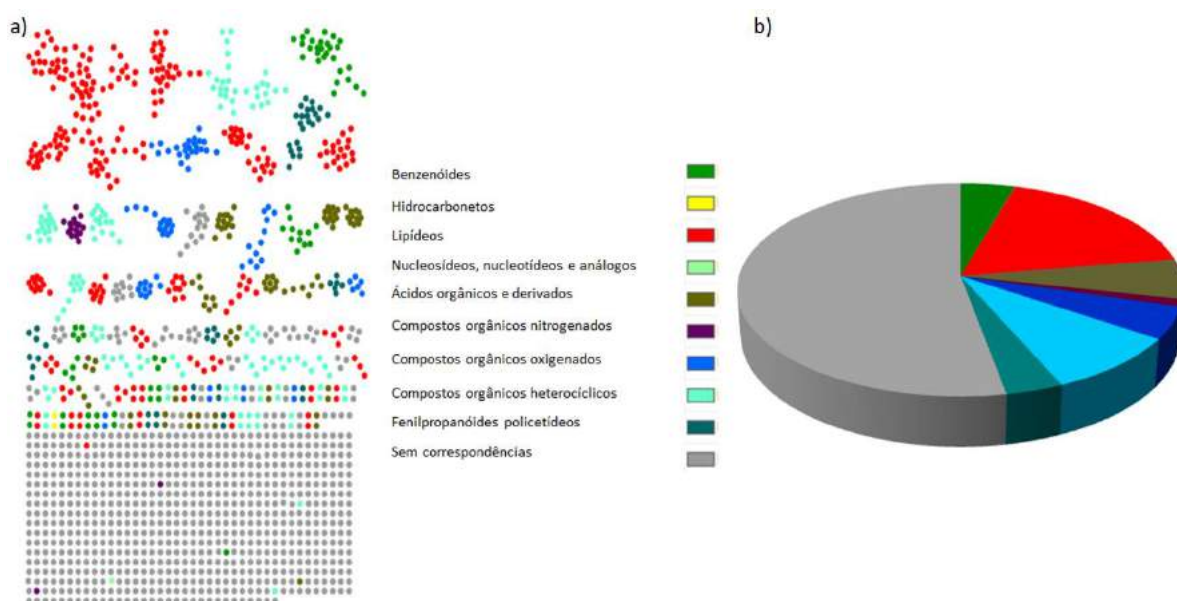


Figura 24. a) Anotação das superclasses químicas dos compostos presentes nos períodos de produção do biofertilizante Vorax® realizada através de análises *in silico*, utilizando a ferramenta *MolNet Enhancer*. **b)** Composição percentual dos compostos pertencentes aos períodos de produção do biofertilizante anotados pelo *MolNet Enhancer*.

A anotação das classes químicas dos metabólitos também foi realizada e é mostrada na **Figura 25**.

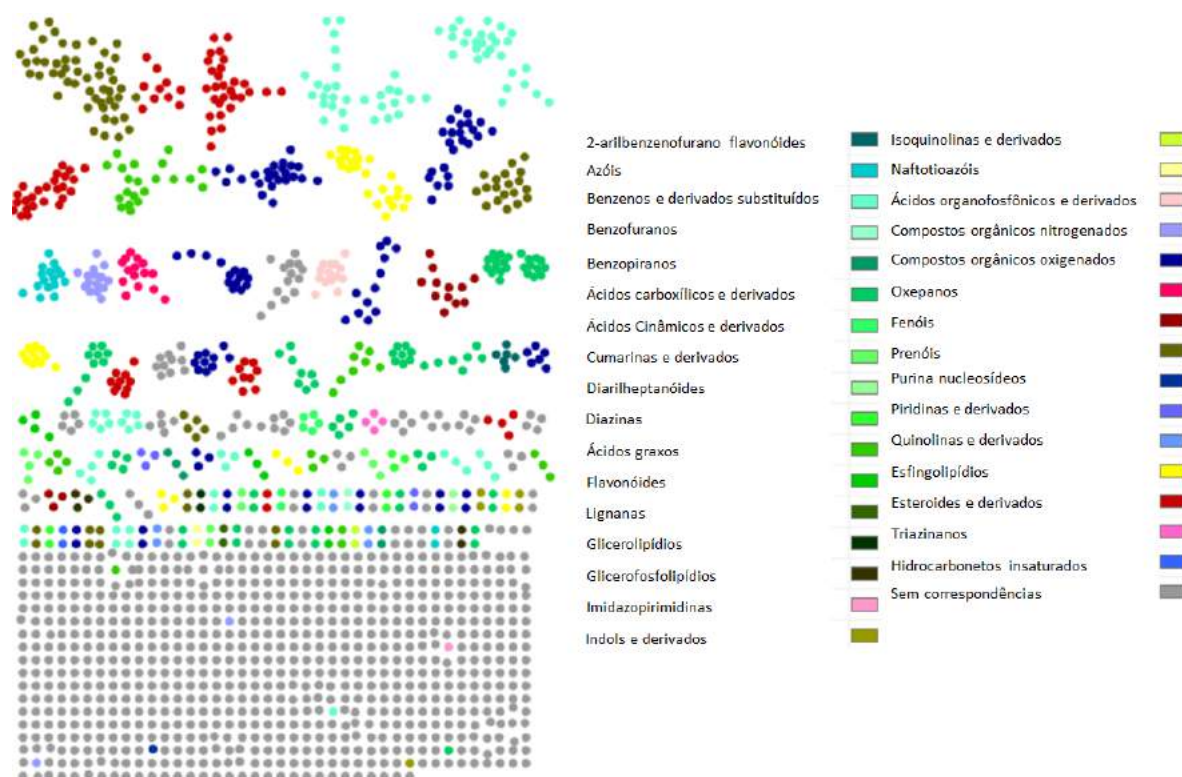


Figura 25. Anotação das classes químicas (nível 3) dos compostos presentes no processo de produção do biofertilizante Vorax® realizada através de análises *in silico*, utilizando a ferramenta *MolNet Enhancer*.

Comparando as redes moleculares formadas e apresentadas na Figura 25 com as redes moleculares apresentadas na Figura 24 é possível ver, por exemplo, que dentre as classes que integram a superclasse de lipídios presentes estão metabólitos anotados como terpenóides (ou compostos semelhantes estruturalmente). A **Figura 26** mostra anotações de nível 3 para metabólitos das classes dos terpenóides. É possível ver que a produção destes metabólitos se inicia a partir do período 0, ou seja, quando a *C. glutamicum* é inoculada no meio de cultivo (KRUBASIK *et al.*, 2001).

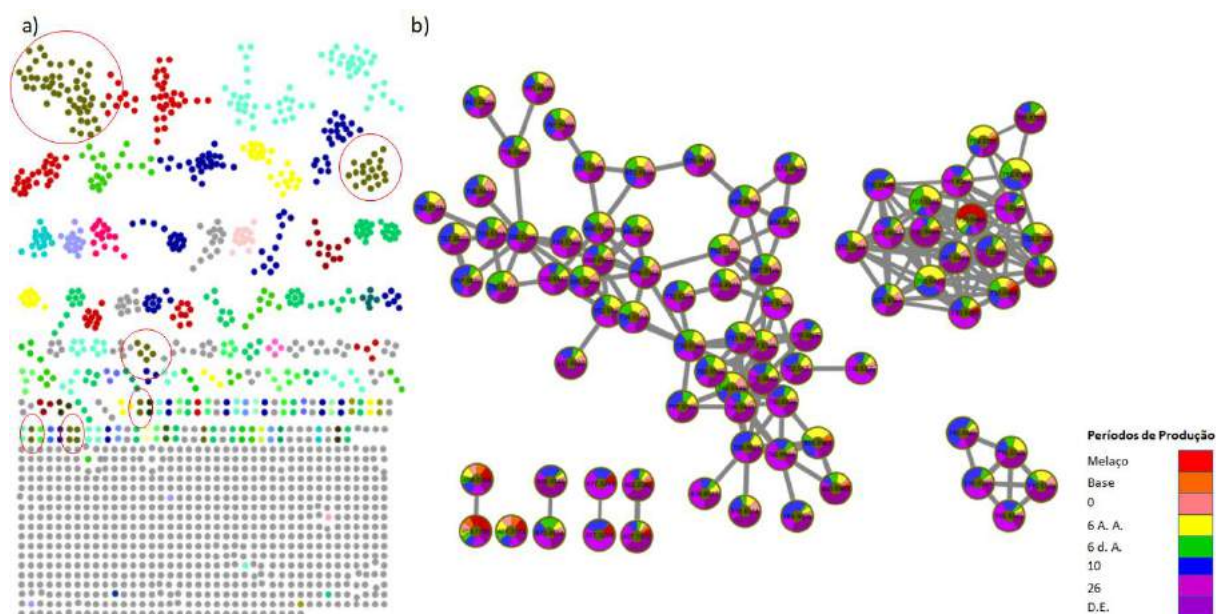


Figura 26. a) Redes moleculares totais formadas pelo *MolNet Enhancer*, com destaque para metabólitos pertencentes à classe dos terpenóides. **b)** Famílias espectrais de metabólitos pertencentes à classe dos terpenóides. O anel interno dos nodos indica que os metabólitos desta classe de compostos são, quase que em sua totalidade, produzidos após a inoculação da *C. glutamicum* no meio de cultivo.

Alguns exemplos de *features* significativos para a classe dos terpenóides foram indicados pelo *loadings plot* fornecido pela análise de PCA são mostrados na **Figura 27**, sendo todos anotações de nível 3.

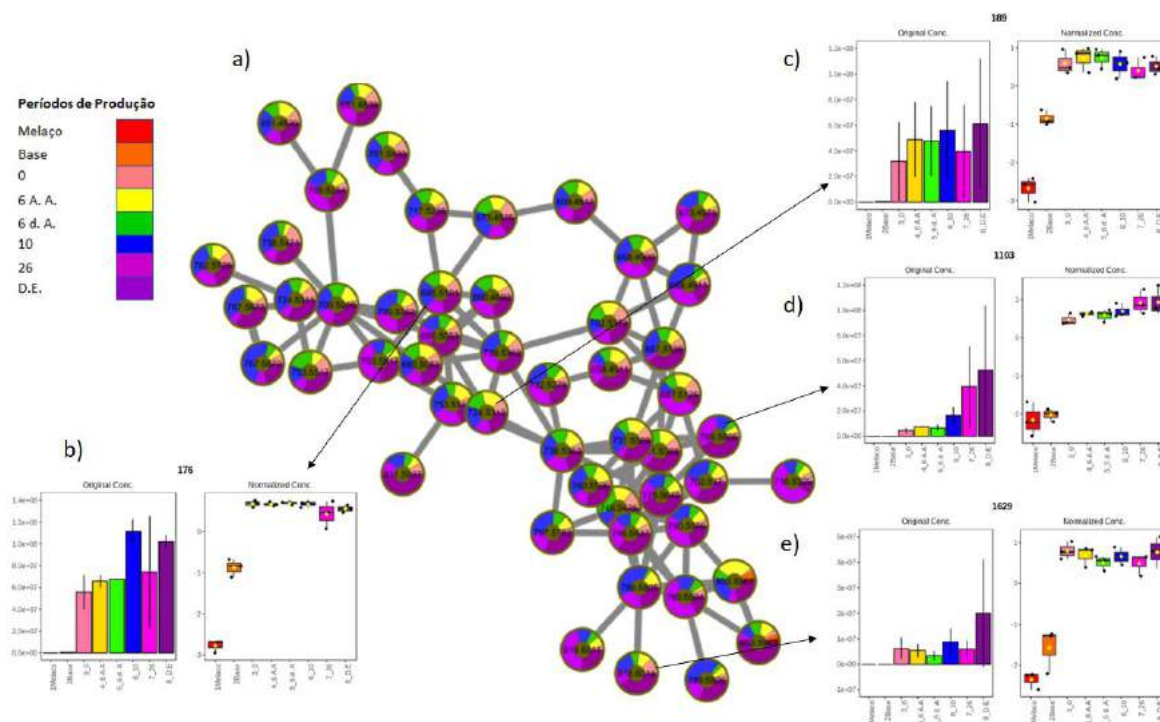


Figura 27. a) Família espectral de metabólitos pertencentes à classe dos terpenóides **b)** *feature* 176, referente ao metabólito *m/z* 695.5101 **c)** *feature* 189, referente ao metabólito *m/z* 724.5312 **d)** *feature* 1103, referente ao metabólito *m/z* 789.5806 **e)** *feature* 1629, referente ao metabólito *m/z* 818.6014. Os gráficos *boxplot* apresentam a área referente ao pico cromatográfico de cada metabólito para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização realizada no tratamento dos dados.

Os terpenóides são sintetizados a partir dos monômeros isopentenil pirofosfato e dimetilalil pirofosfato. Pertencentes a esta classe, os carotenoides são compostos formados a partir de 8 unidades de isopreno e abundantes entre plantas e microrganismos agindo como antioxidantes ou estabilizadores de membranas. Nas plantas, os carotenoides são essenciais no processo de fotossíntese, aumentando a absorção de luz e fotoproteção das plantas contra espécies reativas de oxigênio, auxiliando nas respostas ao estresse de luz. (HEIDER *et al.*, 2012; SWAPNIL *et al.*, 2020). A síntese de alguns carotenoides em *C. glutamicum* é conhecida, ainda que seus mecanismos não tenham sido totalmente elucidados (HEIDER *et al.*, 2012; EGGELING e BOTT, 2005). Ela se dá através da via do não-mavelonato (MEP *pathway*), onde os precursores de carotenoides, farnesil pirofosfato e geranilgeranil pirofosfato são gerados a partir do dimetilalil pirofosfato pela enzima prenil transferase. Duas moléculas de geranilgeranil pirofosfato são condensadas pela enzima fitoeno sintase formando o fitoeno. Em seguida, 4 dessaturações são

realizadas por ação da fitoeno dessaturase formando o licopeno. A enzima licopeno elongase condensa o licopeno formado com o dimetilalil pirofosfato formando o carotenoide acíclico flavuxantin. A ciclização do decaprenoxantin é catalisada pela carotenoide- ϵ -ciclase (HEIDER, 2012). Um esquema da biossíntese é mostrado na **Figura 28**.

Anotações de nível 3 apresentadas na **Figura 29** sugerem a formação desta classe de metabólitos pela bactéria durante seu processo de fermentação, ou seja, a partir do período 0. Uma anotação proposta pelo *Networking Annotation Propagation* para o *feature* 220 ($[M+H]^+$ m/z 701.5289) sugeriu o metabólito (2R,6R,7aR)-2-[(12E)-6,11,15,19,23,27,31-heptametildotriaconta-2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-tetradecaen-2-il]-4,4,7a-trimetil-2,5,6,7-tetraidro-1-benzofuran-6-ol, com estrutura química apresentada na **Figura 29c**. Ainda que não se encontre dados na literatura condizentes com a presença do metabólito sugerido, é visto a semelhança estrutural apresentada entre a sugestão de anotação e o carotenoide decaprenoxantin (**Figura 29d**), um dos principais carotenoides sintetizados pela *C. glutamicum* (HENKE *et al.*, 2017). Entretanto, não foi anotado o carotenoide decaprenoxantin nas famílias espectrais formadas.

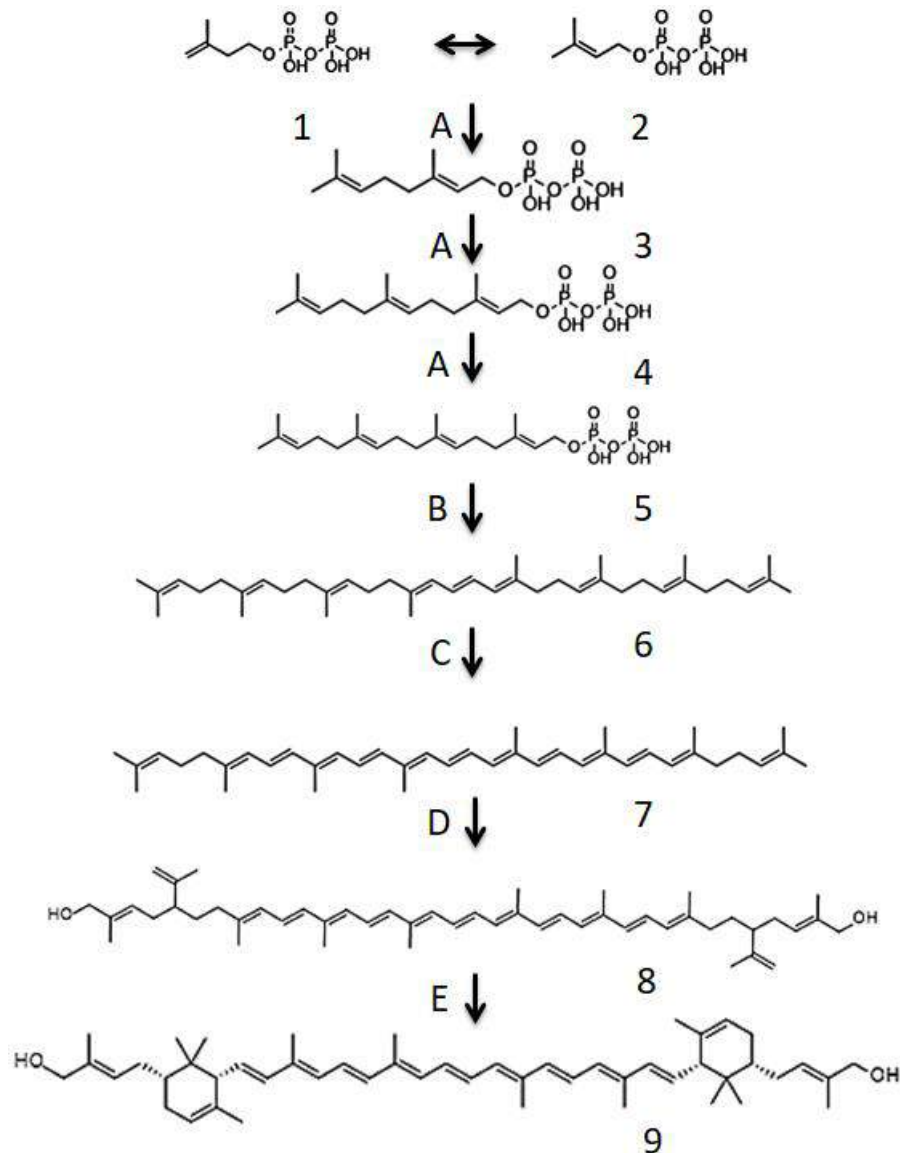


Figura 28. Biossíntese de carotenoides em *C. glutamicum*. **1)** isopentenil pirofosfato **2)** dimetilalil pirofosfato **3)** geranyl pirofosfato **4)** farnesil pirofosfato **5)** geranylgeranyl pirofosfato **6)** fitoeno **7)** licopeno **8)** flavuxantín **9)** decaprenoxantín **A)** prenil transferase **B)** fitoeno sintase **C)** fitoeno dessaturase **D)** licopeno elongase **E)** carotenoide-ε-ciclase. FONTE: Adaptado de HEIDER, 2012.

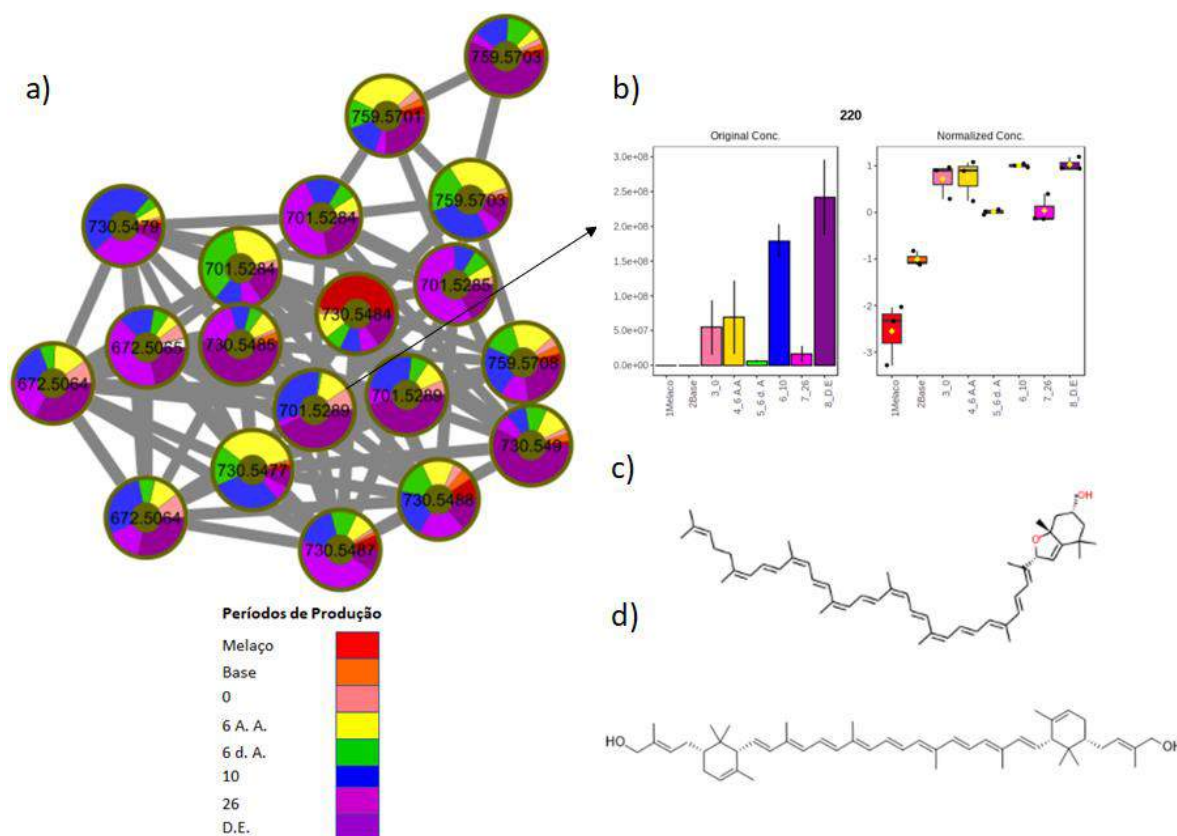


Figura 29. **a)** Família espectral pertencente à classe dos terpenóides. **b)** Gráfico *boxplot* das áreas referente ao pico cromatográfico correspondente ao *feature* 220 (metabólito *m/z* 701.5289) para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização realizada no tratamento dos dados. Apesar dos dados de concentração para o *feature* nos períodos 6 A.A. e 26 não apresentarem uma linearidade esperada, nota-se o aumento da produção deste evidenciada no período final analisado **c)** Anotação de metabólito sugerida pelo *Networking Annotation Propagation*, com ionização $[M+H]^+$ **d)** Fórmula estrutural da decaprenoxantina, um dos carotenoides sintetizados pela *Corynebacterium glutamicum*. Este metabólito não foi anotado nas redes moleculares formadas.

Alguns dos *features* indicados pelo *VIP scores* como diferenciais (ID's 1103, 263, 770 e 599) também pertencem à classe dos terpenóides. Entretanto, *features* de outras classes também foram anotados como diferenciais. A **Figura 30** mostra o metabólito *m/z* 650.4943 (*feature* 1083), anotado com nível 3 e pertencente a classe de compostos orgânicos nitrogenados.

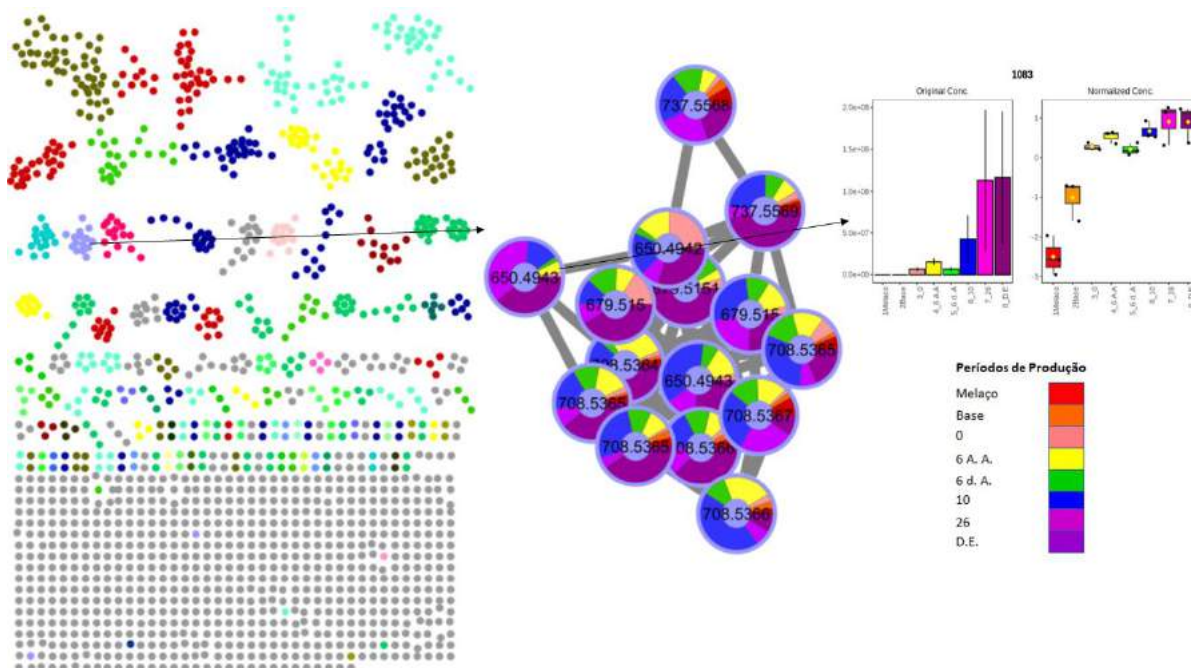


Figura 30. Destaque para uma família espectral da classe dos compostos orgânicos nitrogenados. O *feature* 1083 (metabólito *m/z* 650.4943) foi indicado como diferencial pelo VIP scores do PLS-DA. O gráfico *boxplot* indica a área do pico cromatográfico referente a este metabólito para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados.

Um dos *features* marcados como diferenciais pelo VIP scores (*feature* 1244, *m/z* 165.1387), mostrado na **Figura 31**, não teve sua anotação realizada pelo GNPS através do *MolNet Enhancer*. Porém, após buscas em bancos de dados de espectros de massa (metlin.scripps.edu) e combinando informações obtidas em bancos de dados de compostos naturais (<https://dnpc.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearchResults.xhtml>) sugere-se que o metabólito em questão se trata da 2,3,5-trimetil-6-propilpirazina ($[M+H]^+$ *m/z* 165.1387, $C_{10}H_{17}N_2$). Trabalhos relatam que a *C. glutamicum* é capaz de sintetizar este metabólito (DICKSCHAT *et al.*, 2010) e outros derivados (MORTZFELD *et al.*, 2020). O íon *m/z* 165.1388 encontrado no tempo de retenção 3.71 min. (**Figura 32a**) nos dados brutos de UHPLC-MS/MS dos extratos do biofertilizante aponta a presença do metabólito em questão no biofertilizante. Todavia, apesar do erro referente ao valor de *m/z* observado para o *feature* 1244 apresentar um erro muito baixo em relação ao valor teórico (1.06 ppm), a ausência de informações de MS/MS do metabólito na literatura permite-nos anotá-lo em nível 3.

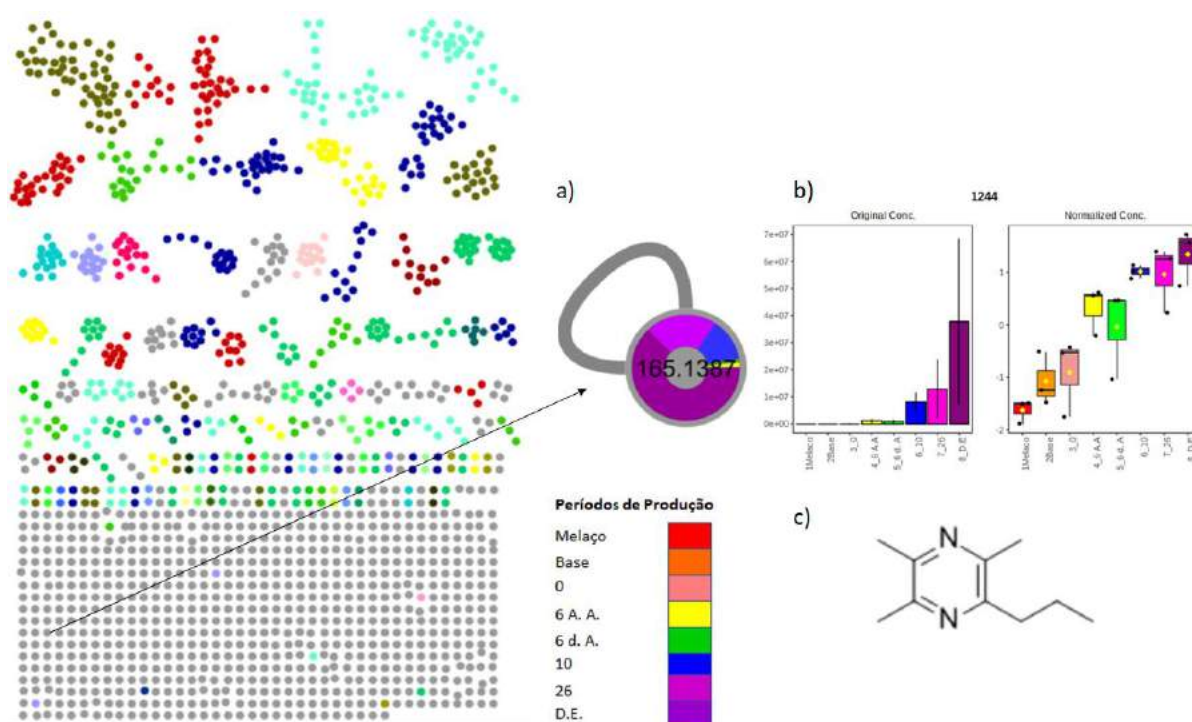


Figura 31. a) Feature 1244 (m/z 165.1387) indicado como diferencial pelo VIP scores do PLS-DA. b) Gráfico *boxplot* indicando a área do pico cromatográfico referente a este metabólito para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. c) Fórmula química estrutural da trimetilpropilpirazina.

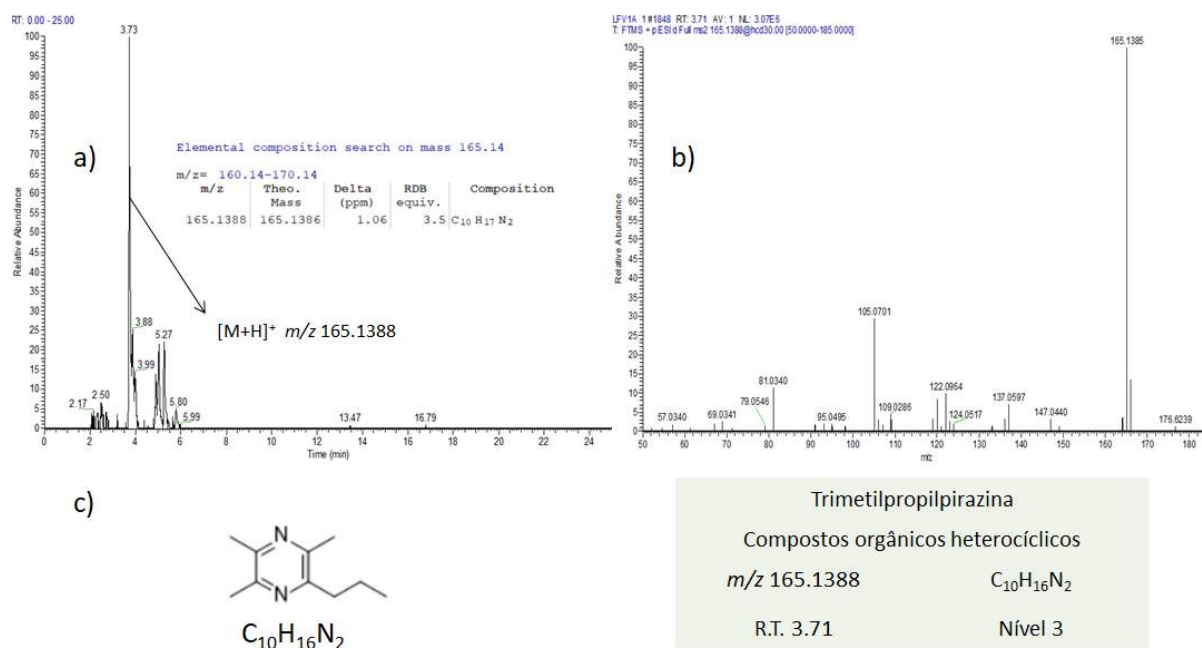


Figura 32. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 165.1388 no biofertilizante Vorax, no tempo de retenção 3.71 min. b) MS/MS obtido para o metabólito c) Fórmula estrutural da trimetilpropilpirazina, anotada a nível 3.

Dentre os compostos discutidos na seção 4.2, anotados pelo *Library Search*, alguns foram agrupados em famílias espectrais e serão mostrados a seguir. O composto N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina, identificado com nível de anotação 1, é visto na **Figura 33**.

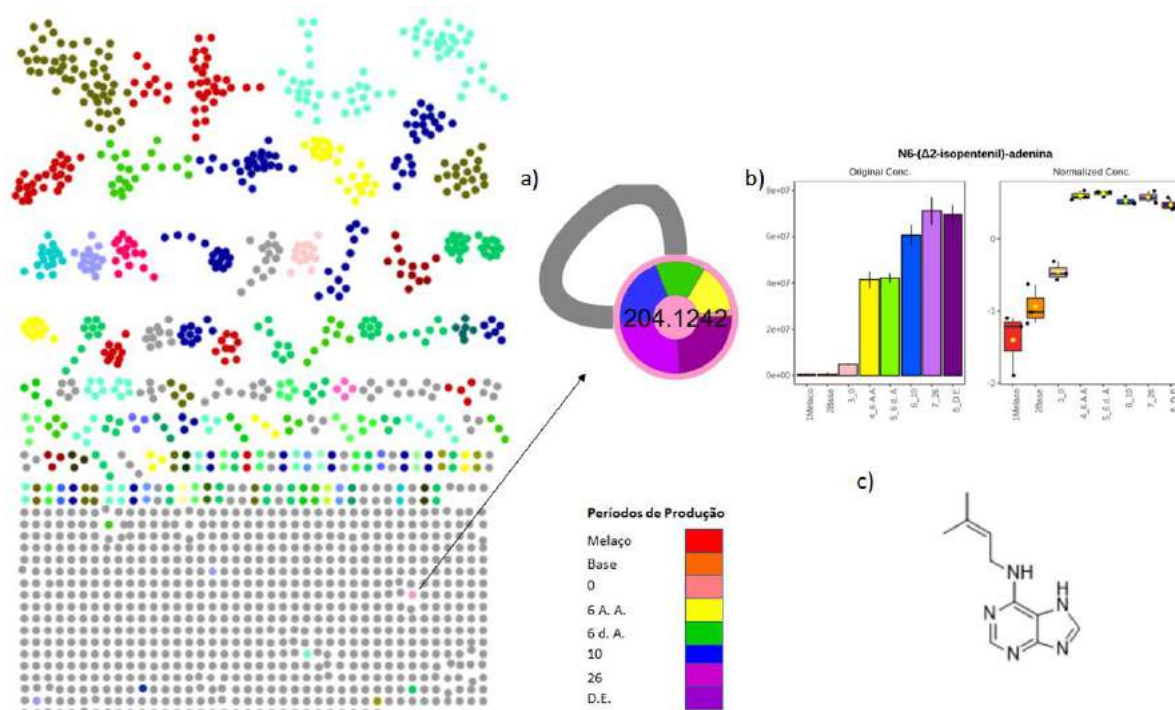


Figura 33. **a)** Nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 204.1242, anotado como N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina e agrupado na classe química das imidazopirimidinas. **b)** Gráfico *boxplot* indicando a área do pico cromatográfico referente a este metabólito para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. **c)** Fórmula estrutural da N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina.

Como citado anteriormente, as citocininas estão envolvidas em processos associados à produtividade das plantas, como resistência a estresses bióticos e abióticos, retardamento da senescência das folhas e na biossíntese de clorofila. Como é visto na Figura 33b, a produção de N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina é iniciada no período 0, ou seja, após a inoculação da *C. glutamicum* no meio de cultivo. No estudo de Seo *et al.* (2016) os pesquisadores identificaram genes na *C. glutamicum* capazes de induzir enzimas produtoras de citocininas conhecidas como LOG (“Lonely guy”). A constatação se deu mediante comparação estrutural com enzimas LOGs presentes em outros organismos, como a *Arabidopsis thaliana* e o fungo *Mycobacterium marinum*. As enzimas LOG ativam as citocininas via

defosforibolização, hidrolisando diretamente a ligação entre a base N6 substituída e a ribose 5'-monofosfato no precursor da citocinina, o iPRMP (isopentenil ribosídeo mono fosfato).

A biossíntese da N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina em *C. glutamicum* se dá pela prenilação do dimetilalil pirofosfato, oriundo da via do não-mavelonato, no grupo amino N6 em nucleotídeos de adenosina (AMP, ADP ou ATP). A enzima adenilato dimetilaliltransferase (isopentenil transferase) catalisa esta reação. Citocininas ribosídeo 5'-tri ou difosfatos são desfosforiladas pela ação da enzima fosfatase. E, finalmente, a citocinina ribosídeo 5'-monofosfato é convertida à N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina através da ação da enzima específica fosforibohidrolase “lonely guy” (LOG) (SEO *et al.*, 2016; FRÉBORTOVÁ e FRÉBORT, 2021). A **Figura 34** ilustra a formação da N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina.

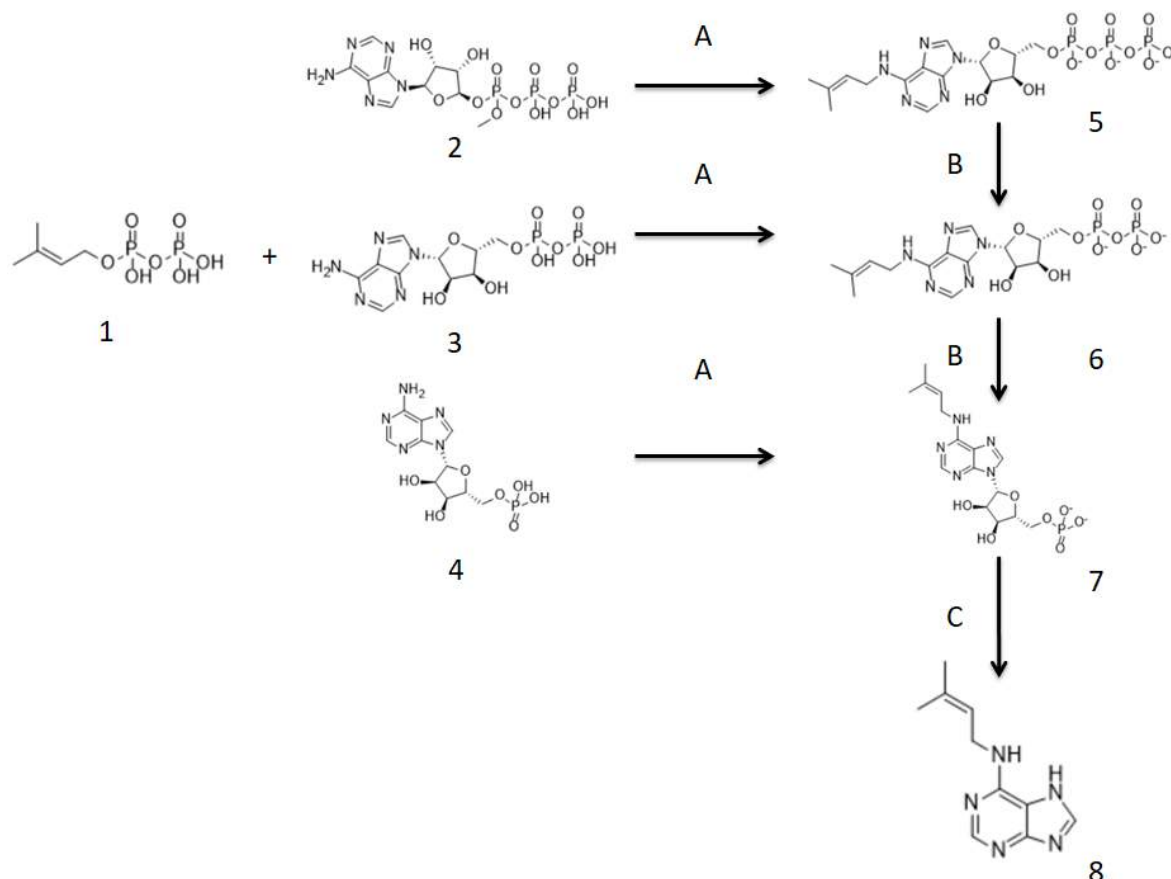


Figura 34. Biossíntese da N6-(Δ²-isopentenil)-adenina em *C. glutamicum*. **1)** Dimetilalil difosfato **2)** Adenosina trifosfato **3)** Adenosina difosfato **4)** Adenosina monofosfato **5)** isopentenil-adenina ribosídeo 5'-trifosfato **6)** isopentenil-adenina ribosídeo 5'-difosfato **7)** isopentenil-adenina ribosídeo 5'-monofosfato **8)** N6-(Δ²-isopentenil)-adenina **A)** dimetilaliltransferase **B)** fosfatase **C)** citocinina fosforibohidrolase “lonely guy” - LOG. FONTE: Adaptado de FRÉBORTOVÁ e FRÉBORT, 2021.

Em um estudo de mapeamento genético realizada pela empresa GoGenetic (Curitiba/PR), contratado pela empresa fabricante do biofertilizante, foi constatada a presença de genes envolvidos na biossíntese das enzimas necessárias para a formação de terpenóides na cepa de *C. glutamicum* utilizada na fabricação do produto. Tal como na biossíntese de terpenóides, a biossíntese da citocinina N6-(Δ²-isopentenil)-adenina também utiliza de unidades de isopentenil pirofosfato. A **Figura 35** mostra que 24% dos genes da bactéria foram identificados e relacionados a vias metabólicas. Em destaque é visto que genes identificados à biossíntese de lipídeos e, em especial, à síntese de terpenóides (aqui, marcado como isoprenóides - *isoprenoids*, do inglês).

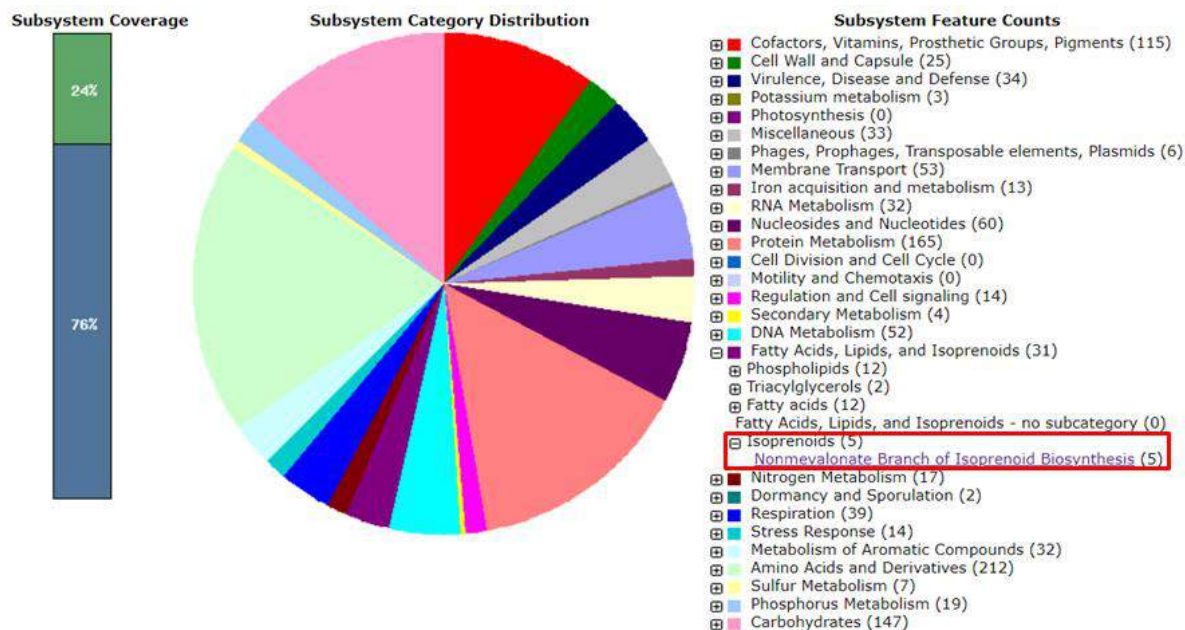
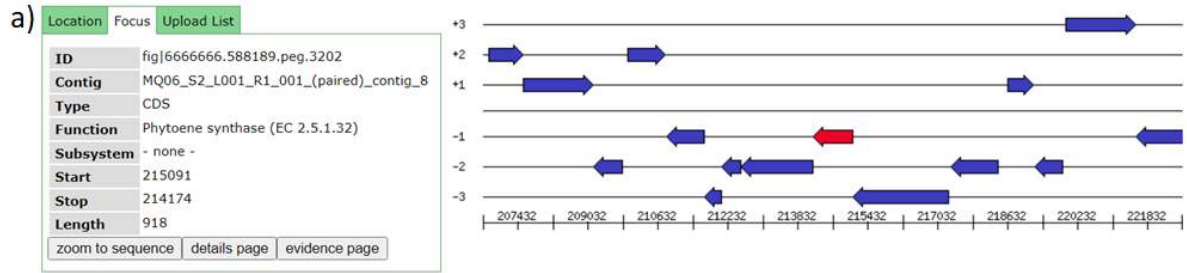


Figura 35. Identificação das vias metabólicas envolvidas de acordo com os genes presentes na cepa da *C. glutamicum*, utilizada para a fabricação do biofertilizante Vorax®. O estudo identificou 24% dos genes totais da bactéria. Os genes identificados na biossíntese de terpenóides confirmam que as enzimas presentes fazem parte da via do não-mavelonato.

Foi realizada uma busca manual dos genes codificantes das enzimas envolvidas nas vias biossintéticas expressas nas Figuras 28 e 34. Encontrou-se 4 genes codificantes referentes à biossíntese dos terpenóides e 1 referente à biossíntese de isopenteniladenina e os resultados obtidos são mostrados na **Figura 36**.

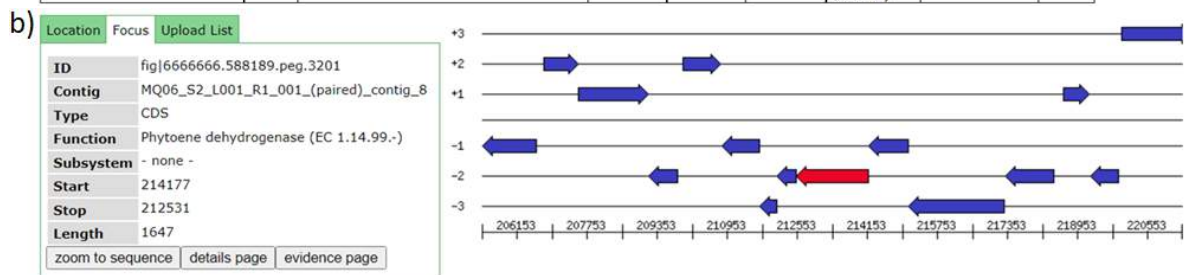


[export table](#) [clear all filters](#)

display 15 items per page

displaying 1 - 1 of 1

Feature ID ▲▼	Type ▼	Contig ▲▼	Start ▲▼	Stop ▲▼	Length (bp) ▲▼	Function ▲▼	Subsystems ▲▼	Region
	CD ▼	MQ06_S2_L001_R1_001_(paired)_contig_8	< ▼	< ▼	< ▼	2.5.1.32		
fig 6666666.588189.peg.3202	CDS	MQ06_S2_L001_R1_001_(paired)_contig_8	215091	214174	918	Phytoene synthase (EC 2.5.1.32)	- none -	show

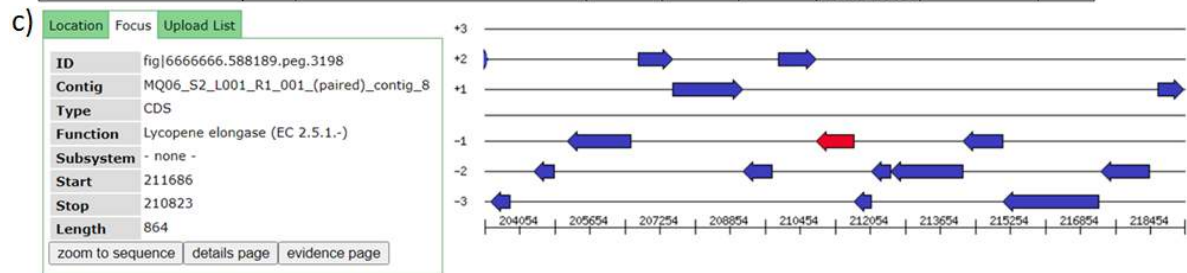


[export table](#) [clear all filters](#)

display 15 items per page

displaying 1 - 2 of 2

Feature ID ▲▼	Type ▼	Contig ▲▼	Start ▲▼	Stop ▲▼	Length (bp) ▲▼	Function ▲▼	Subsystems ▲▼	Region
	CD ▼	MQ06_S2_L001_R1_001_(paired)_contig_8	< ▼	< ▼	< ▼	phytoene deh		
fig 6666666.588189.peg.3061	CDS	MQ06_S2_L001_R1_001_(paired)_contig_8	75472	76887	1416	Phytoene dehydrogenase and related proteins	- none -	show
fig 6666666.588189.peg.3201	CDS	MQ06_S2_L001_R1_001_(paired)_contig_8	214177	212531	1647	Phytoene dehydrogenase (EC 1.14.99.-)	- none -	show



[export table](#) [clear all filters](#)

display 15 items per page

displaying 1 - 1 of 1

Feature ID ▲▼	Type ▼	Contig ▲▼	Start ▲▼	Stop ▲▼	Length (bp) ▲▼	Function ▲▼	Subsystems ▲▼	Region
	CD ▼	MQ06_S2_L001_R1_001_(paired)_contig_8	< ▼	< ▼	< ▼	lycop		
fig 6666666.588189.peg.3198	CDS	MQ06_S2_L001_R1_001_(paired)_contig_8	211686	210823	864	Lycopene elongase (EC 2.5.1.-)	- none -	show

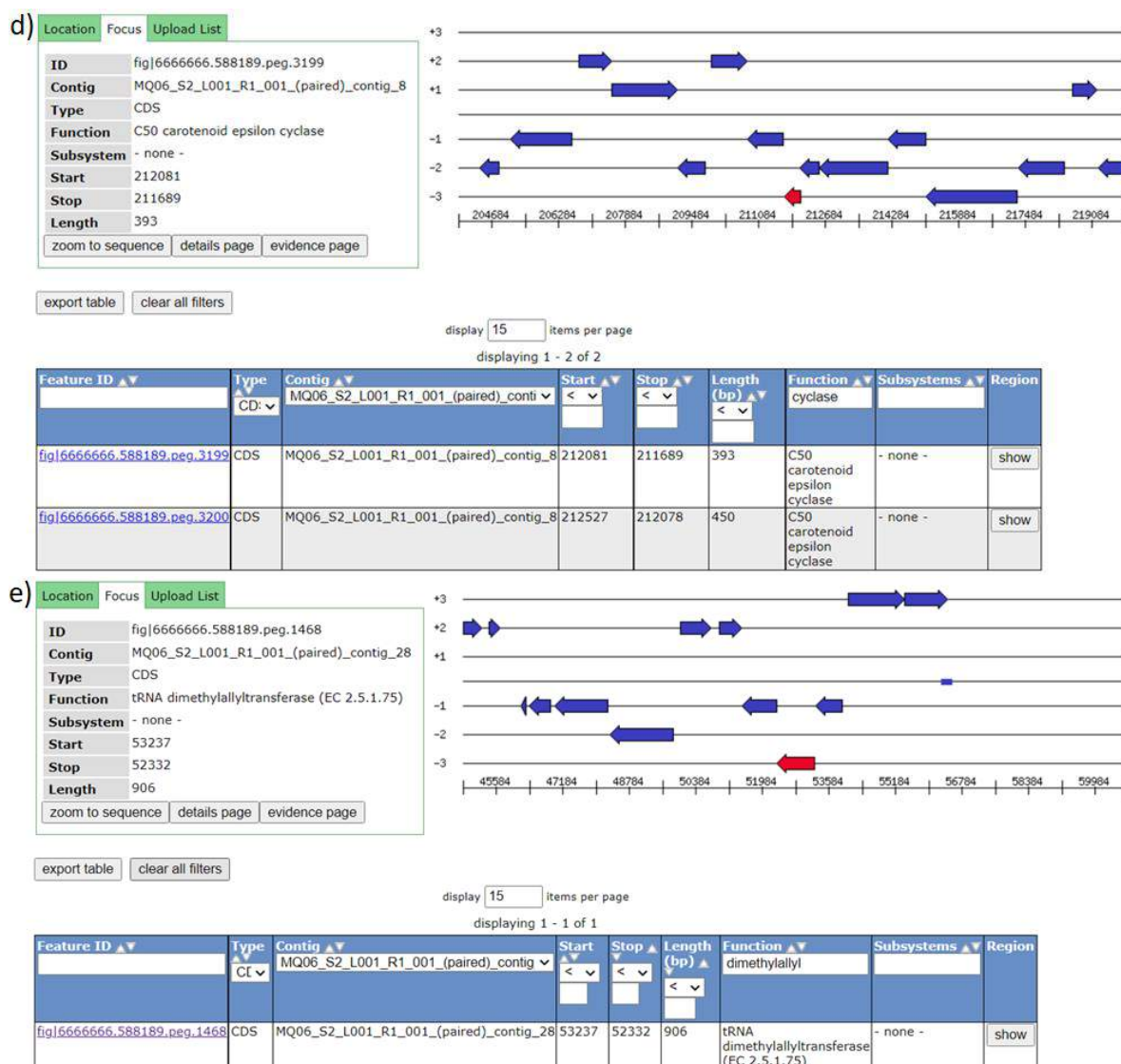


Figura 36. Resultados obtidos para a busca manual dos genes codificantes referentes à biossíntese das enzimas de terpenóides e de N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina. **a)** Genes codificantes da enzima fitoeno sintase. **b)** Genes codificantes da enzima fitoeno dessaturase (ou desidrogenase). **c)** Genes codificantes da enzima licopeno elongase. **d)** Genes codificantes da enzima carotenoide- ϵ -ciclase. **e)** Genes codificantes da enzima dimetilaliltransferase.

A constatação da presença dos genes codificantes para as enzimas envolvidas na biossíntese de terpenóides (fitoeno sintase, fitoeno dessaturase, licopeno elongase, carotenoide- ϵ -ciclase e dimetilaliltransferase) endossam a capacidade da produção de metabólitos desta classe de compostos pela cepa de *C. glutamicum* utilizada no processo produtivo do biofertilizante.

Outro metabólito discutido anteriormente cuja anotação foi realizada pelo GNPS, e aqui classificada pelo *MolNet Enhancer* na classe dos ácidos carboxílicos e

derivados, foi o aminoácido ácido glutâmico. Como visto na **Figura 37**, uma família espectral para este metabólito foi formada.

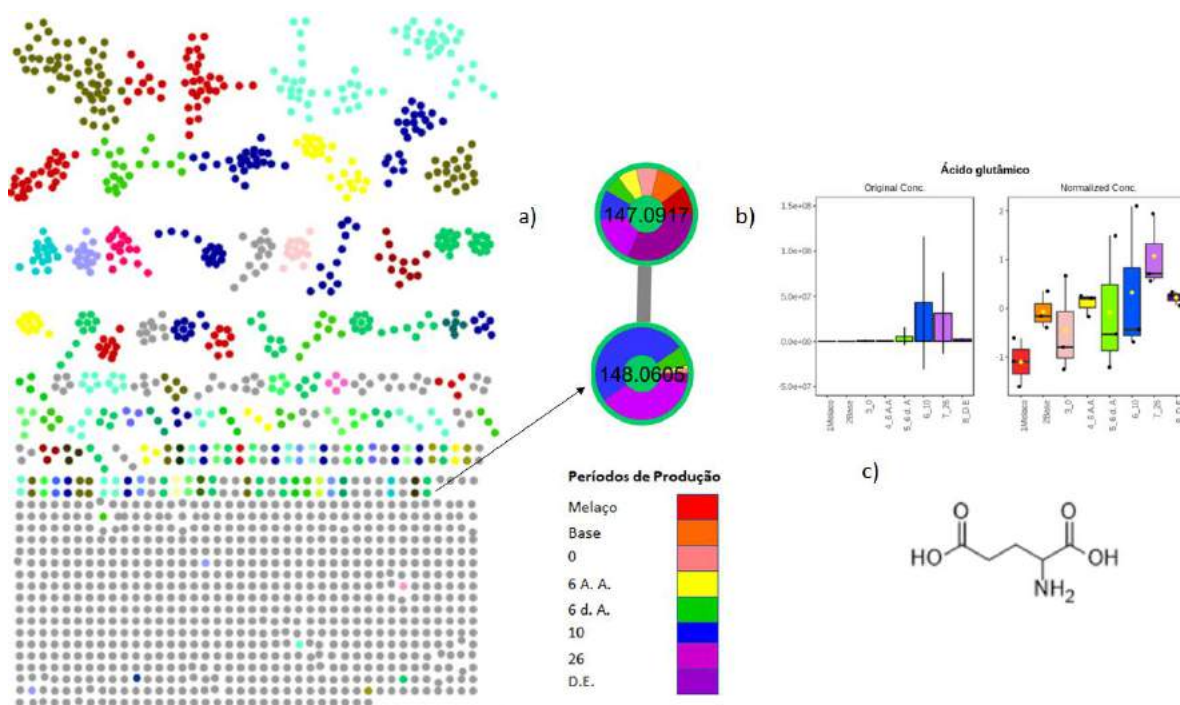


Figura 37. **a)** Família espectral com anotação para a classe dos ácidos carboxílicos e derivados (com anotação de subclasse para aminoácidos), em destaque o nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 148.0605, anotado como ácido glutâmico. **b)** Gráfico *boxplot* indicando a área referente do pico cromatográfico referente a este metabólito para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. **c)** Fórmula estrutural do ácido glutâmico.

A produção de ácido glutâmico pela *C. glutamicum* é bem conhecida na literatura (LEE *et al.*, 2016). Como mostrado na Figura 36, sua síntese inicia-se após a inoculação da bactéria no meio de cultivo e também se pode notar que há um decréscimo deste metabólito entre a penúltima e última etapa do processo produtivo, o que pode sugerir uma degradação do composto, visto que a última etapa é seguida de um processo de aumento de temperatura. Um nodo adjacente, correspondente a um metabólito de m/z 147.0917 foi anotado em nível 3, na mesma classe química.

A **Figura 38** mostra outros dois metabólitos, swertisina ($[M+H]^+$ m/z 447.1285) e ácido siríngico ($[M+H]^+$ m/z 199.0601), que foram anotados anteriormente.

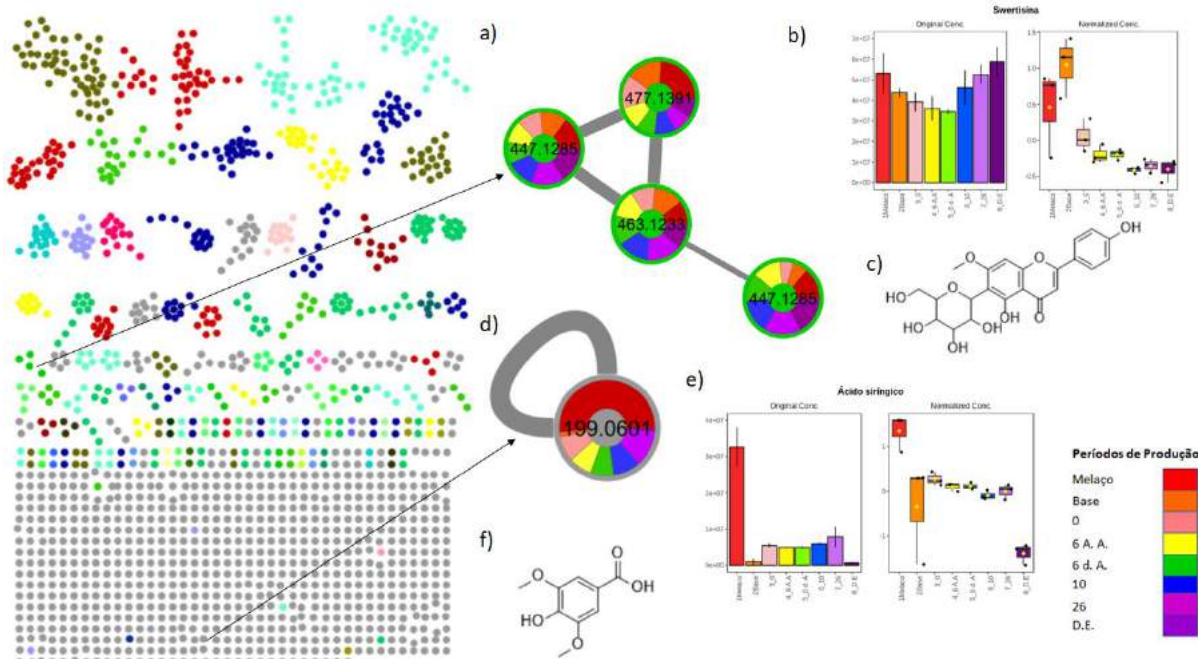


Figura 38. a) Família espectral com anotação para a classe dos flavonoides (com anotação de subclasse para flavonoides glicosilados), em destaque o nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 447.1285, anotado como swertisina. b) Gráfico *boxplot* indicando a área referente do pico cromatográfico referente a swertisina para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. c) Fórmula estrutural da swertisina. d) Nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 199.0601, anotado como ácido siríngico. Não houve anotação de classe química. e) Gráfico *boxplot* indicando a área do pico cromatográfico referente ao ácido siríngico para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. f) Fórmula estrutural do ácido siríngico.

Os metabólitos swertisina e ácido siríngico pertencem à classe dos compostos fenólicos. A presença destes compostos em melão de cana-de açúcar já foi relatada por Deseo *et al.* (2020). A análise dos gráficos referentes às áreas da média dos picos cromatográficos indica há um decréscimo na concentração destes compostos (principalmente do ácido siríngico), entre a penúltima e última etapa do processo de produção. Como também citado anteriormente, provavelmente esta queda na concentração nesta última etapa se deva a uma degradação térmica de parte do metabólito presente. Entre os períodos 26 e D.E. ocorre um aumento de temperatura que é decorrente do processo produtivo.

As Figuras 39 e 40 apresentam outros metabólitos que foram anotados anteriormente.

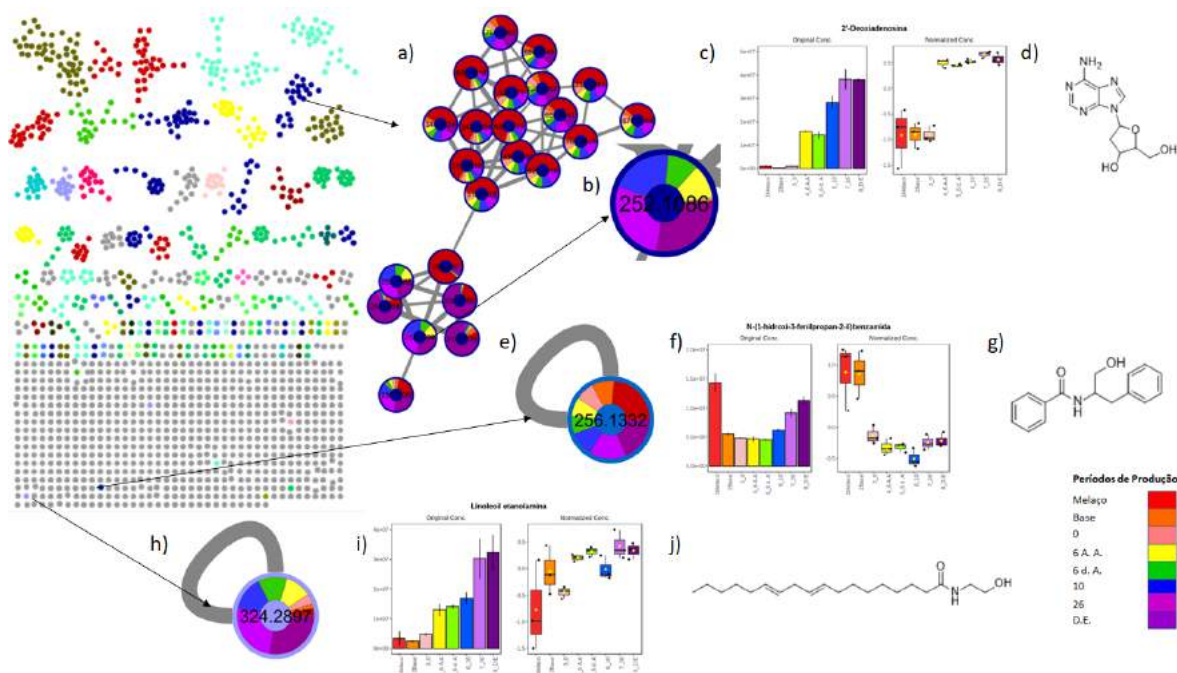


Figura 39. a) Família espectral com anotação para a classe dos compostos orgânicos oxigenados b) Destaque do nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 252.1086, anotado como 2'-deoxiadenosina c) Gráfico *boxplot* indicando a área referente do pico cromatográfico referente a 2'-deoxiadenosina para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados d) Fórmula estrutural da 2'-deoxiadenosina. e) Nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 256.1332, anotado como N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)benzamida e anotação para a classe dos compostos benzênicos e derivados f) Gráfico *boxplot* indicando a área do pico cromatográfico referente a N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)benzamida para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados g) Fórmula estrutural da N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)benzamida. h) Nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 324.2897, anotado como linoleil etanolamida e anotação para a classe de compostos orgânicos nitrogenados i) Gráfico *boxplot* indicando a área do pico cromatográfico referente a linoleil etanolamida para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. j) Fórmula estrutural da linoleil etanolamida.

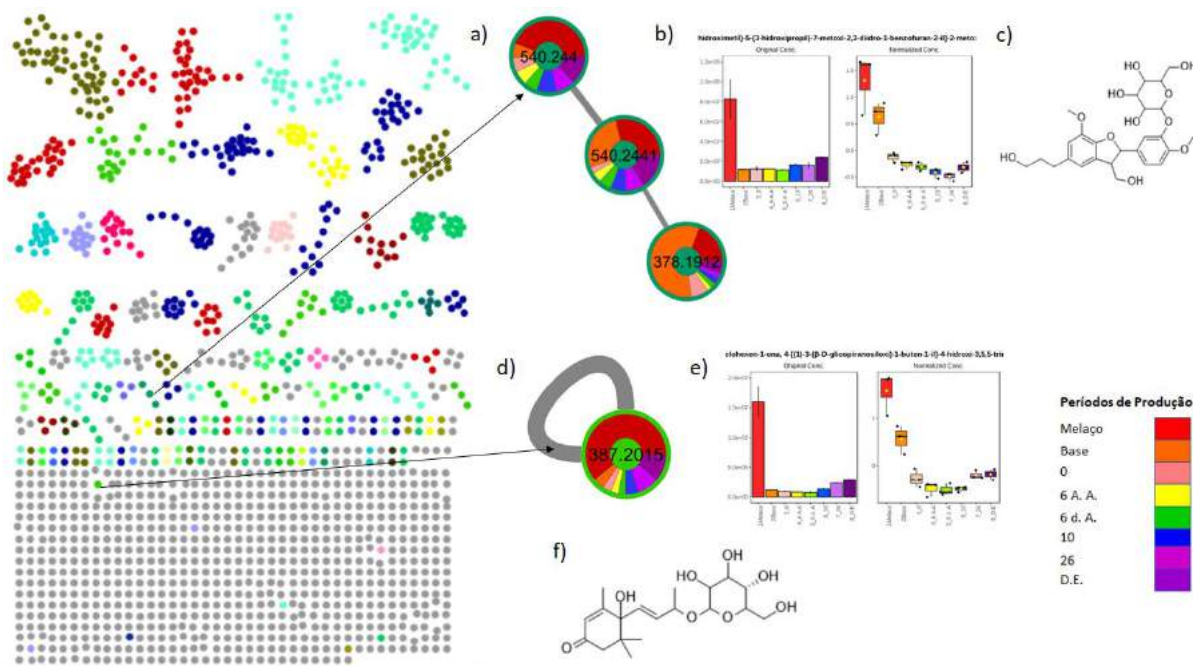


Figura 40. **a)** Família espectral com anotação para a classe dos benzofuranos, em destaque o nodo pertencente ao íon $[M+NH_4]^+$ m/z 540.2440, anotado como 2-(hidroximetil)-6-[5-[3-(hidroximetil)-5-(3-hidroxipropil)-7-metoxi-2,3-diidro-1-benzofuran-2-il]-2-metoxifenoxi]oxano-3,4,5-triol **b)** Gráfico *boxplot* indicando a área referente do pico cromatográfico referente a este metabólito para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. **c)** Fórmula estrutural do metabólito **d)** Nodo pertencente ao íon $[M+H]^+$ m/z 387.2015, anotado como 2-Ciclohexen-1-ona, 4-[(1)-3-(β -D-glicopiranosiloxi)-1-buten-1-il]-4-hidroxi-3,5,5-trimetil **e)** Gráfico *boxplot* indicando a área do pico cromatográfico referente ao metabólito para cada um dos períodos de produção, antes e após a normalização dos dados. **f)** Fórmula estrutural do 2-Ciclohexen-1-ona, 4-[(1)-3-(β -D-glicopiranosiloxi)-1-buten-1-il]-4-hidroxi-3,5,5-trimetil.

Os metabólitos 2'-deoxiadenosina e a linoleoil etanolamida, mostrados na Figura 39, apresentam aumentos das áreas referentes às médias dos picos cromatográficos relativos aos períodos após a inoculação da bactéria, o que sugere uma superexpressão no decorrer do processo produtivo. Os metabólitos mostrados na Figura 40 apresentaram-se como fazendo parte da composição do melaço-de-cana.

Algumas anotações bastante interessantes (seja em nível 1, 2 ou 3) de metabólitos com bioatividades descritas na literatura foram realizadas para o biofertilizante Vorax®. Com a análise realizada pelo FBMN é visto que há muitos metabólitos de interesse dentre os anotados que já se encontravam inicialmente no meio de cultivo, o melaço de cana-de-açúcar, sendo detectados também no produto

final. O melaço é composto, em sua maior parte, por água, sacarose, glicose e frutose, cinzas e sais minerais. Entretanto, sua composição irá variar de acordo com a região, tipo de solo e clima no qual a cana de açúcar é cultivada (JAMIR *et al.*, 2021; DOTANIYA *et al.*, 2016; PALMONARI *et al.*, 2020). Estudos acerca de metabólitos secundários presentes no melaço de cana-de-açúcar estão quase que restritos às classes de compostos fenólicos (ALI *et al.*, 2019; JAMIR *et al.*, 2021; DESEO *et al.*, 2020). O melaço possui muitas aplicações, podendo ser utilizado na fabricação de etanol, na alimentação animal (DOTANIYA *et al.*, 2016; JAMIR *et al.*, 2021) e como meio de cultivo para microrganismos (BENTO *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2015). Além disso, já foi descrita sua utilização no combate e controle de nematoides em plantações de tomate (VAWDREY e STIRLING, 1997) e como fertilizante do solo, impactando significativamente na produção de espinafre (PYAKUREL *et al.*, 2019). Aumentos significativos na biomassa e produção de beterrabas também foram observados quando da mistura deste com esterco de cabras (NADEEKA e SERAN, 2020). Resultados expressivos no aumento de biomassa e da enzima superóxido dismutase em canola também foram observados por Li *et al.* (2020), quando aplicado em baixas concentrações. Devido a grande concentração de compostos fenólicos no melaço, estudos acerca dos benefícios trazidos à saúde devido ao seu consumo moderado têm sido realizados (SINGH *et al.*, 2015; WRIGHT *et al.*, 2014).

4.4 Ensaios *in vivo*

Dentre os produtos agrícolas de destaque no cenário nacional encontra-se o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), sendo o Brasil um dos maiores produtores e consumidores (USDA, 2019). Esta é, também, uma das mais antigas culturas domesticadas das Américas e um dos mais importantes legumes produzidos e consumidos no mundo, sendo uma das principais fontes de proteína, fibras, carboidratos complexos, vitaminas e minerais para milhões de pessoas em países desenvolvidos e em desenvolvimento (MESQUITA *et al.*, 2007; BROUGHTON *et al.*, 2003).

Neste contexto, devido à importância apresentada por esta cultura no cenário nacional e mundial, optou-se pela sua utilização nos ensaios *in vivo* com o biofertilizante e suas frações.

4.4.1 Germinação de sementes de *P. vulgaris* utilizando soluções do biofertilizante Vorax® e frações obtidas a partir de uma purificação parcial do mesmo

Sendo produto de uma fermentação bacteriana em uma complexa matriz vegetal como meio de cultivo, buscou-se realizar uma partição do produto através de uma cromatografia em coluna, utilizando gel-Sephadex®, como descrito na seção 3.3. Assim, a partição dos metabólitos no produto ajudaria a elucidar quais destes (ou grupos destes) mais contribuem para alcançar os efeitos benéficos que resultam em maior produtividade e qualidade na colheita. Neste sentido, foram utilizadas sementes de feijão (*P. vulgaris*) para a realização de ensaios de germinação, aplicando-se soluções do biofertilizante Vorax® e soluções das frações obtidas para avaliação da biomassa formada. Para os grupos controle foi utilizado água desmineralizada.

Os resultados dos ensaios de germinação de sementes de *P. vulgaris* (como descrito na seção 3.5.1) utilizando solução do biofertilizante e das suas seis frações obtidas (na concentração de 300 ppm) são mostrados na **Figura 41**.

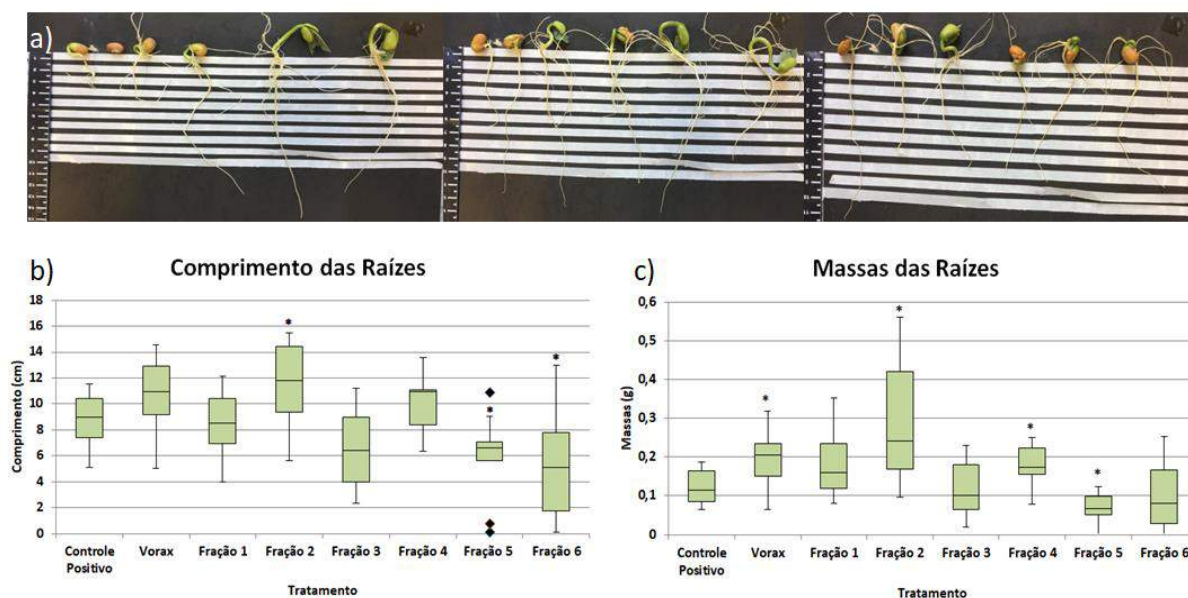


Figura 41. Resultados obtidos para os ensaios de germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* utilizando o biofertilizante Vorax® e as frações obtidas a partir deste. **a)** Sementes germinadas ao final do experimento. Os gráficos *boxplot* **b)** e **c)** mostram, respectivamente, a dispersão dos valores de comprimento e massa obtidos para as raízes formadas para cada tratamento. Símbolos ♦ expressos nos gráficos denotam *outliers* e asteriscos (*)

representam valores significativamente diferentes em relação ao grupo controle ($p < 0.05$, teste T-Student / Mann-Whitney-Wilcoxon).

A germinação é uma etapa crítica do desenvolvimento de uma planta. Seu sucesso é controlado por fatores endógenos e ambientais como luz, temperatura, umidade entre outros (BHATTACHARJEE, 2008). Sendo assim, estando a semente na presença de certos metabólitos, estes podem contribuir para estimular ou retardar sua germinação.

A Figura 41 traz informações acerca da biomassa formada a partir das sementes de feijão. Na Figura 41b são exibidos os resultados dos comprimentos das raízes oriundas das sementes. Aumentos médios para os tratamentos com o Vorax[®], fração 2 e fração 4 são vistos (17,14, 30,67 e 14,32%, respectivamente), no entanto, apenas a fração 2 atingiu nível de significância em relação ao controle. Para a Figura 41c, que mostra os resultados obtidos para as massas das raízes formadas, os mesmos tratamentos destacados na Figura 41b são os melhores valores obtidos e todos apresentam significância em relação ao tratamento controle. Os aumentos médios registrados foram de, respectivamente, 58,63, 137,58 e 49,42%. Os valores obtidos para ambos os parâmetros para a fração 5 também mostram-se diferenciais, no entanto, negativamente.

4.4.2 Aplicação foliar em plantas de *P. vulgaris* utilizando soluções do biofertilizante Vorax[®] e frações obtidas a partir de uma purificação parcial do mesmo

A aplicação foliar (ou adubação foliar) é uma técnica que fornece nutrientes às plantas através de soluções ou suspensões destes. Usada corretamente pode ser mais eficiente, econômica e ecológica para suplementar à fertilização do solo. A aplicação foliar supera algumas limitações da fertilização do solo, como lixiviação, precipitação insolúvel de fertilizantes, antagonismo entre certos nutrientes, solos heterogêneos inadequados para baixas dosagens e reações de fixação/absorção, como no caso de fósforo e potássio (KAUSHAL *et al.*, 2014). Os primeiros estudos acerca do tema datam do início do século 19 (Gris, 1843) (FERNÁNDEZ *et al.*, 2009), no entanto, métodos e estudos para pesquisas dos mecanismos envolvidos no processo só foram possíveis no século 20 (FERNÁNDEZ *et al.*, 2009; KANNAN, 2010). Fernández *et al.* (2015) descreve em seu livro uma

abordagem aprofundada dos mecanismos envolvidos na absorção dos nutrientes através das folhas das plantas. Neste sentido, foi usada a técnica de aplicação foliar em plantas *P. vulgaris* usando soluções do biofertilizante Vorax® e de suas frações. Tal como no ensaio de germinação de sementes, buscou-se avaliar a bioatividade de alguns metabólitos sobre as plantas que receberam a aplicação de soluções do biofertilizante comparando com aquelas que receberam soluções das frações obtidas a partir da purificação parcial do biofertilizante. As amostras controle foram tratadas apenas com água desmineralizada.



Figura 42. Ensaio de aplicação foliar em plantas de *P. vulgaris* realizado em casa de vegetação **a)** Plantas de *P. vulgaris* 4 dias após sementeira **b)** Aplicação foliar das soluções 10 dias após sementeira **c)** Plantas de *P. vulgaris* 10 dias após sementeira **d)** Plantas de *P. vulgaris* no dia da avaliação (27 dias após sementeira) **e)** Clorofilômetro utilizado para leitura de clorofilas totais **f)** Avaliação do comprimento de raízes e partes aéreas das plantas **g)** Pós secagem da biomassa obtida **h)** Pesagem das raízes e partes aéreas das plantas do ensaio.

A **Figura 42** ilustra os diferentes tempos do ensaio realizado com as plantas utilizadas no estudo e as **Figuras 43 e 44** apresentam os resultados da biomassa obtida após os tratamentos comparando os comprimentos e massas (frescas e secas) das raízes e massas aéreas formadas.

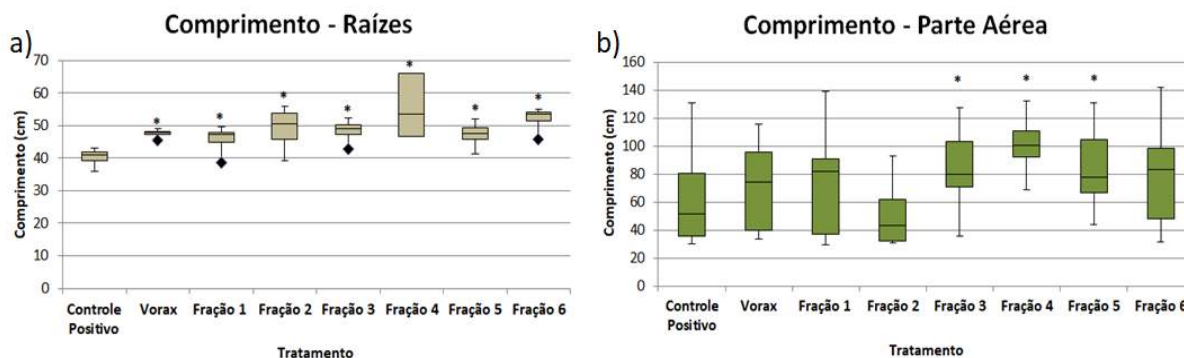


Figura 43. Resultados obtidos para os ensaios de aplicação foliar em plantas de *P. vulgaris* utilizando o biofertilizante Vorax[®] e as frações obtidas a partir deste. Os gráficos *boxplot* **a)** e **b)** mostram, respectivamente, a dispersão dos valores de comprimento das raízes e parte aérea obtida para cada tratamento. Símbolos ♦ expressos nos gráficos denotam *outliers* e asteriscos (*) representam valores significativamente diferentes em relação ao grupo controle. ($p < 0.05$, teste T-Student / Mann-Whitney-Wilcoxon).

A avaliação da biomassa formada nas plantas de feijão após a aplicação do biofertilizante, das frações deste e do grupo controle foi realizada comparando os comprimentos obtidos para, respectivamente, as raízes e parte aérea. Na primeira imagem podemos notar que todos os tratamentos mostraram aumentos significativamente diferenciáveis em relação ao tratamento controle, enquanto pode ser visto na Figura 43b que apenas as frações 3, 4 e 5 atingiram este patamar, sendo que a fração 4 mostrou um comprimento médio 66% superior em relação ao controle. Ainda que os resultados obtidos a partir da aplicação do biofertilizante não tenham atingido valores significativamente diferenciáveis pode-se notar que a mediana dos valores registrados encontra-se perto de 80 cm, enquanto que o grupo controle registra esse valor em torno de 50 cm, indicando uma tendência de aumento para este parâmetro. A seguir são mostrados os resultados para as massas frescas e secas com as plantas utilizadas no ensaio.

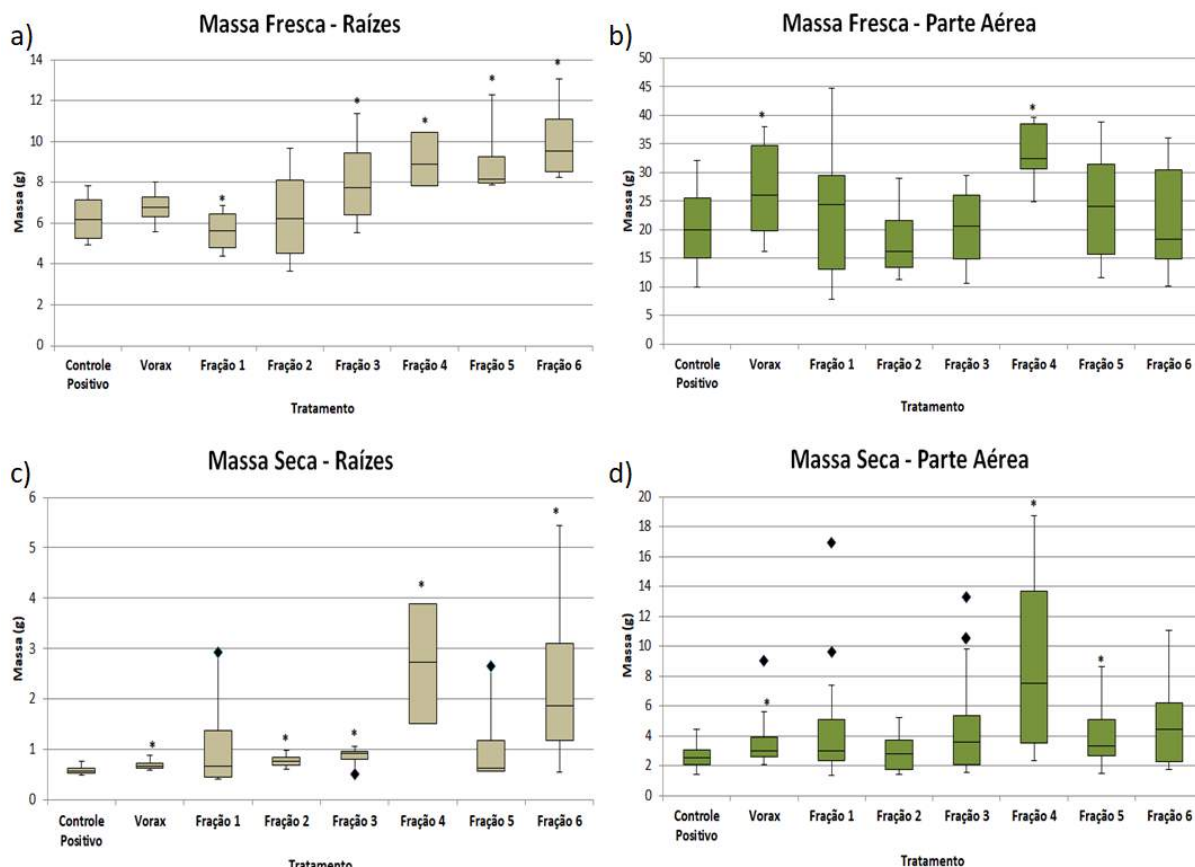


Figura 44. Resultados obtidos para os ensaios de aplicação foliar em plantas de *P. vulgaris* utilizando o biofertilizante Vorax® e as frações obtidas a partir deste. Os gráficos *boxplot* **a)** e **b)** mostram, respectivamente, a dispersão dos valores de massa fresca das raízes e parte aérea obtida para cada tratamento e os gráficos *boxplot* **c)** e **d)** mostram, respectivamente, a dispersão dos valores de massa seca das raízes e parte aérea obtida para cada tratamento. Símbolos ♦ expressos nos gráficos denotam *outliers* e asteriscos (*) representam valores significativamente diferentes em relação ao grupo controle ($p < 0.05$, teste T-Student / Mann-Whitney-Wilcoxon).

Levando-se em consideração os valores obtidos para as massas frescas, a Figura 44a mostra que massas das raízes das plantas que receberam as soluções das frações 3, 4, 5 e 6 apresentaram valores significativamente superiores daqueles encontrados para o grupo controle. Na Figura 44b, comparando o valor da massa da parte aérea, vemos que este patamar de significância foi obtido apenas para os tratamentos das plantas que receberam as soluções do biofertilizante e da fração 4. Os aumentos médios registrados foram de 31,5% e 63,8%, respectivamente.

Após o procedimento de secagem das raízes e partes aéreas (conforme descrito na seção 3.5.2), novamente foi realizada a avaliação das massas obtidas. A Figura 44c mostra que todas as plantas, com exceção daquelas que receberam

soluções da fração 1, obtiveram valores de massa seca de raízes significativamente superiores em relação ao grupo controle. Na Figura 44d é possível ver que apenas as plantas cujos tratamentos receberam a aplicação de soluções do biofertilizante e soluções das frações 4 e 5 apresentaram valores de massa fresca de parte aérea significativamente superiores em relação ao tratamento controle.

Em uma análise parcial, é possível notar que houve um ganho de biomassa nas plantas submetidas ao tratamento com o biofertilizante Vorax® em quase todos os parâmetros avaliados e que a fração 4 mostrou-se diferencial em relação às demais, atingindo quase sempre os maiores valores de biomassa formada. Sendo a produção de biomassa quase que totalmente dependente da fotossíntese realizada pela planta (O'CONNOR, 2003), seria esperado que estes tratamentos apresentassem valores também superiores em relação aos outros. A **Figura 45** mostra os valores médios das leituras de clorofilas totais realizados para cada tratamento. As leituras foram realizadas em 4 períodos, sendo o primeiro antes da aplicação foliar das soluções, e as demais nas 3 semanas que sucederam o experimento.

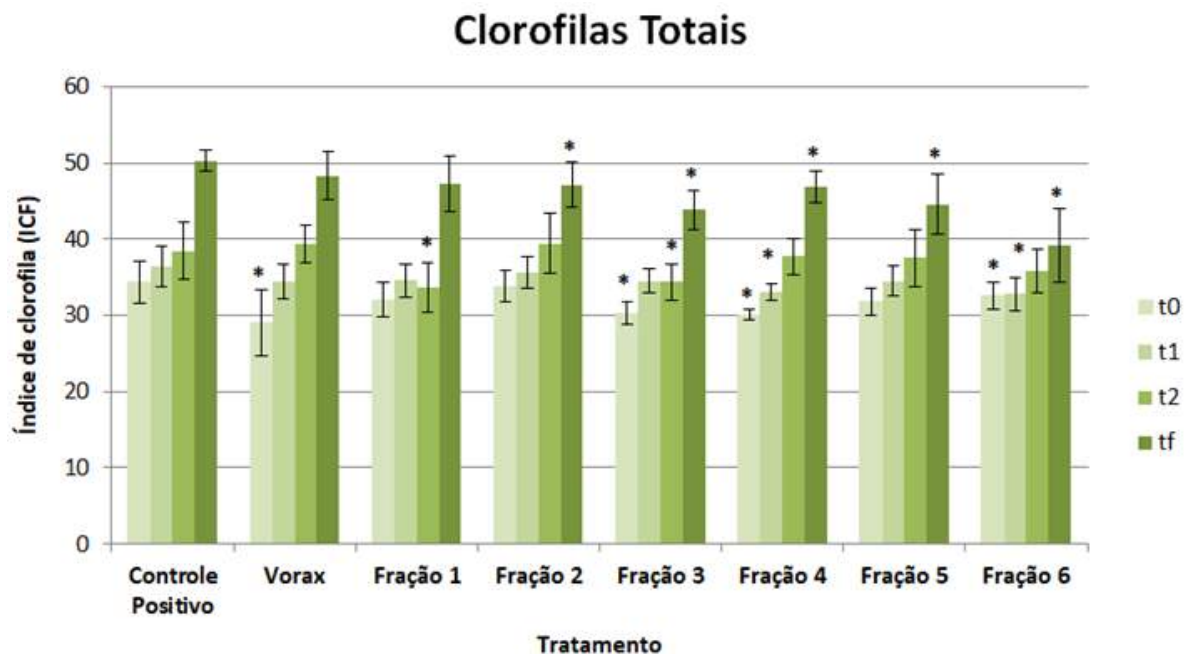


Figura 45. Valores médios de clorofilas totais em *Phaseolus vulgaris* obtidos para cada tratamento. As aplicações das soluções de biofertilizante e suas frações foram realizadas após t_0 e as leituras de clorofilas totais em t_1 , t_2 e t_f foram realizadas nas semanas que sucederam a aplicação das soluções. Barras de erros indicam valores de desvio padrão. Valores destacados com um asterisco (*) denotam valores significativamente diferentes em relação ao grupo controle ($p < 0.05$, teste T-Student / Mann-Whitney-Wilcoxon).

A Figura 45 mostra que houve incrementos substanciais de clorofilas totais em quase todos os tratamentos a partir de t_0 , sendo estes menos pronunciados nas plantas que receberam soluções da fração 2 e fração 6. É possível ver também que houve mudanças significativas nas quantidades de clorofilas totais para quase todos os tratamentos. Porém, comparando com os valores registrados para o grupo controle é mostrado que a significância apresentada é para valores inferiores. Entretanto, o valor médio de clorofilas totais em t_0 para o grupo controle é superior em relação a todos os demais. Desta maneira, para saber o incremento registrado na quantidade de clorofilas totais para cada tratamento foi calculado a diferença entre t_f e t_0 . A **Figura 46** mostra os aumentos percentuais de clorofilas totais no período compreendido entre t_0 e t_f para as plantas que receberam as soluções em cada tratamento.

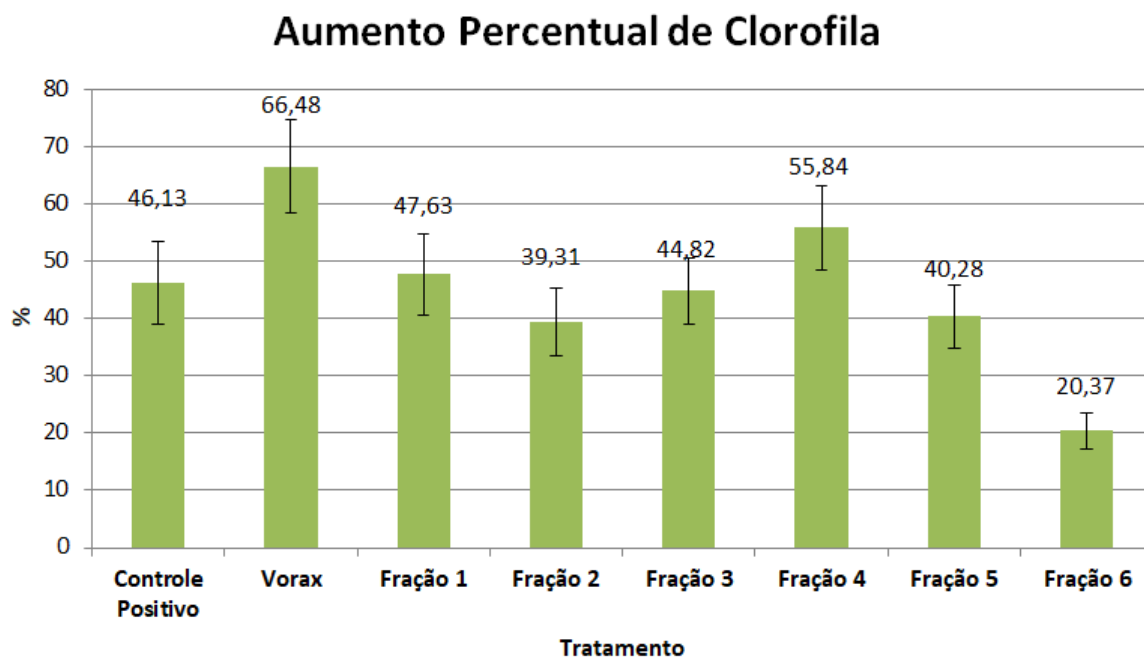


Figura 46. Aumento percentual de clorofilas totais para cada tratamento entre os períodos t_0 e t_f .

O aumento percentual na quantidade média de clorofilas totais produzidas pelo tratamento com o biofertilizante Vorax® e o tratamento com a fração 4 estão de acordo com o que era esperado, dado que estes foram os maiores produtores de biomassa. Seria esperado valores maiores para o tratamento das plantas que receberam a solução da fração 4 em relação as plantas que receberam solução do biofertilizante, visto que aquele produziu um aumento percentual maior de biomassa. Entretanto, a produção fotossintética é apenas um dos fatores responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento da planta (HOFIUS *et al.*, 2007).

4.5 Análise composicional das Frações obtidas do biofertilizante Vorax®

Para tentar compreender as diferenças observadas entre os tratamentos efetuados nos ensaios *in vivo* com a aplicação das soluções do biofertilizante Vorax® e de suas frações, foi realizada uma análise acerca dos metabólitos presentes nestas. A anotação dos metabólitos presentes nas frações foi realizada mediante análises utilizando o *Library search*. Buscou-se pelos metabólitos anotados nos dados brutos de UHPLC-MS/MS das frações a partir das informações dos tempos de retenção informados. As áreas dos picos referentes a cada metabólito anotado foram integradas utilizando o software *Xcalibur 3.0.63* e o gráfico mostrado na

Figura 47 foi feito utilizando o *software* Excel. Este exhibe, em escala logarítmica, as integrais das áreas dos metabólitos anotados nas frações 1 a 6.

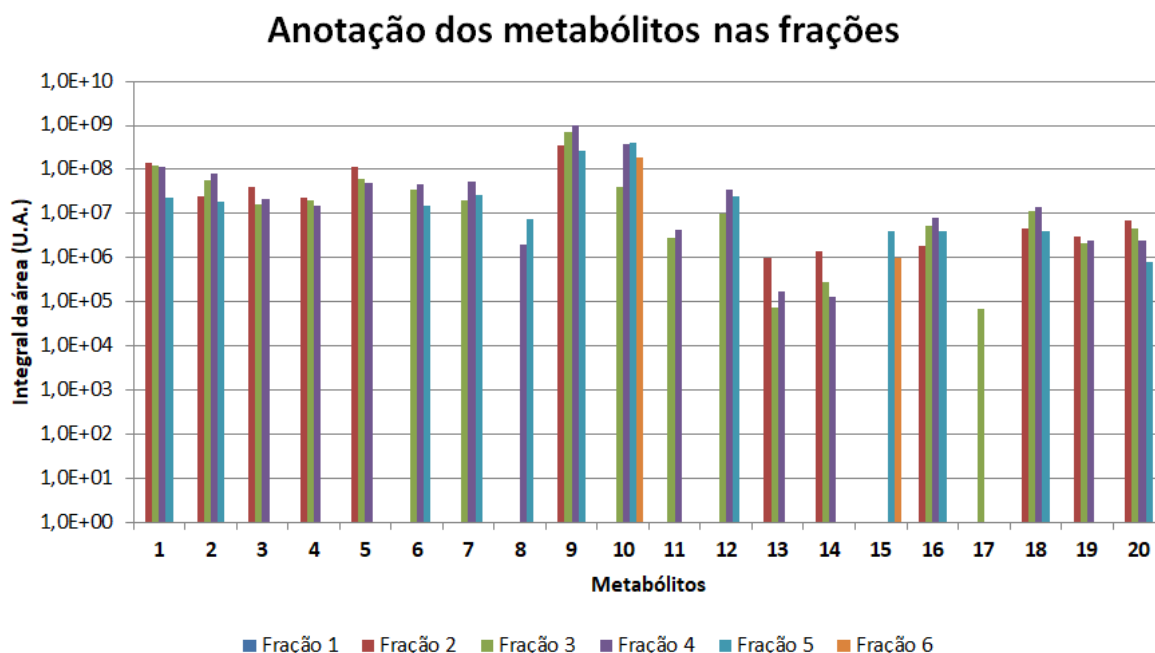


Figura 47. Gráfico (em escala logarítmica) dos metabólitos anotados nas frações de 1 a 6. Cada uma das cores representa a fração analisada e o tamanho das barras compreende a integral da área do pico correspondente a cada metabólito anotado. Na sequência: **1)** Ácido glutâmico (m/z 148.0608), **2)** *N*-(2-feniletil)acetamida (m/z 164.1071), **3)** 2-Ciclohexen-1-ona, 4-[(1)-3-(β -D-glicopiranosiloxi)-1-buten-1-il]-4-hidroxi-3,5,5-trimetil (m/z 387.2015), **4)** 2-(hidroximetil)-6-[5-[3-(hidroximetil)-5-(3-hidroxipropil)-7-metoxi-2,3-diidro-1-benzofuran-2-il]-2-metoxifenoxi]oxano-3,4,5-triol (m/z 540.2441), **5)** Ácido 13-ceto-9,11-octadecadienóico (m/z 295.2269), **6)** Loliolide (m/z 197.1180), **7)** N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina (m/z 204.1245), **8)** Ácido siríngico (m/z 199.0608), **9)** Piridoxina (m/z 170.0817), **10)** 2'-deoxiadenosina (m/z 252.1090), **11)** *N*-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)benzamida (m/z 256.1332), **12)** Swertisina (m/z 447.1285), **13)** Ácido linoleico (m/z 281.2475), **14)** Ácido linolênico (m/z 279.2318), **15)** Ácido *p*-cumárico (m/z 165.0547), **16)** 6-metil cumarina (m/z 161.0598), **17)** Linoleoil etanolamida (m/z 324.2898), **18)** Ácido abscísico (m/z 247.1329), **19)** Jasmonoil leucina (m/z 324.2170), **20)** (2,3,4,5,6)-2-[4-[(3,3a,6,6a)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrofuro[3,4-*c*]furan-6-il]-2,6-dimetoxifenoxi]-6-(hidroximetil)oxano-3,4,5-triol (m/z 598.2493).

As anotações para os metabólitos presentes nas frações obtidas a partir do GNPS não contemplou todos aqueles anotados anteriormente (Tabela 3). Para tanto, uma busca manual nos dados brutos de UHPLC-MS/MS foi, também,

realizada. A Figura 47 mostra que nenhum dos metabólitos foi anotado como presente na fração 1, o que pode justificar os resultados não significativos obtidos em relação ao controle positivo. As frações 2 e 5 contam com 12 dos metabólitos anotados. As frações 3 e 4 possuem as maiores quantidades, sendo 18 metabólitos cada e, na fração 6, apenas 2 metabólitos.

Resultados apresentados na Figura 41 para a formação de biomassa mostram que os tratamentos com o biofertilizante e as frações 2 e 4 se sobrepuseram em relação aos demais tratamentos, tendo alcançado resultados significativamente superiores. Neste sentido, uma das possíveis razões pelas quais sementes que receberam a solução da fração 2 terem obtido maiores valores médios encontra-se no fato desta fração conter uma maior concentração, quando comparado às demais frações, de alguns ácidos graxos poli-insaturados, tais como o ácido 13-ceto-9,11-octadecadienóico, ácido linoleico e o ácido linolênico. Este último metabólito é precursor do ácido 12-oxo-fitodienóico que, por sua vez, é precursor do fitormônio ácido jasmônico (WASTERNAK *et al.* 2013). Enomoto e Miyamoto (2021), através de análises de espectrometria de massas por imageamento (MSI), identificaram concentrações do ácido linolênico em sementes de feijão nas radículas e na casca, sugerindo que o metabólito poderia servir como fonte de carbono e energia para a maturação e germinação das sementes. Assim, uma maior disponibilidade deste metabólito no meio poderia propiciar um melhor desenvolvimento das raízes. Por outro lado, a presença do metabólito anotado como ácido *p*-cumárico nas frações 5 e 6 pode estar relacionado com o baixo desenvolvimento das raízes nestes tratamentos, ainda que apenas o tratamento da fração 5 tenha apresentado resultado significativamente inferior em relação ao controle positivo. Zanardo *et al.* (2008) verificou que a aplicação exógena de ácido *p*-cumárico em soja (*Glycine max* (L.) Merr.) induz a interrupção prematura do crescimento de raízes. Tal efeito poderia estar ligado à redução da atividade da enzima fenilalanina amônia liase ocasionado pelo acúmulo de seu inibidor, cinamato.

Os resultados obtidos para a aplicação foliar da solução do biofertilizante e de suas frações são apresentados nas Figuras 43 e 44. Significativos ganhos de biomassa em relação ao tratamento positivo foram verificados para alguns dos tratamentos, com destaque para a fração 4, a qual exibiu-se como diferencial em todos os parâmetros analisados. Ainda que grande parte dos metabólitos de diferentes classes químicas que foram anotados tenha sido detectada nesta fração

alguns se destacam pela sua maior concentração e por resultados previamente descritos na literatura, como a piridoxina (CZÉGÉNY *et al.* 2019; SOLTANI *et al.* 2012) e a citocinina N6-(Δ^2 -isopentenil)-adenina (HÖNIG *et al.*, 2018; GUO *et al.*, 2014; MÜLLER, 2021; CORTLEVEN *et al.*, 2014). E, também, a possível presença de outros metabólitos não anotados pode, também, ter contribuído positiva ou negativamente para os resultados obtidos para os ensaios de germinação e aplicação foliar. Entretanto, os resultados apresentados na Figura 46 mostram que as plantas que receberam soluções do biofertilizante Vorax[®] exibiram maiores taxas de produção de clorofilas totais, o que pode expor um possível efeito sinérgico entre todos os metabólitos presentes na composição deste tornando-o capaz de ativar diferentes rotas metabólicas e, por consequência, auxiliar no desenvolvimento das plantas.

4.6 Testes antifúngicos de soluções do biofertilizante Vorax[®] frente aos fungos *Fusarium graminearum* e *Penicillium digitatum*

A atividade antifúngica do biofertilizante Vorax[®] foi investigada através de testes de Concentração Inibitória Mínima (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) frente aos fungos *Penicillium digitatum* e *Fusarium graminearum*. Tais microrganismos foram selecionados devido ao fato de ambos causarem perdas no pós-colheita, gerando grandes prejuízos ao setor agrícola (ARAÚJO *et al.*, 2019; DWEBA *et al.*, 2017). Ensaios foram realizados utilizando o biofertilizante diluído para concentrações próximas àquelas de sua aplicação, sendo feitos em sextuplicatas para o biofertilizante e em triplicatas para os controles positivo e negativo. A **Figura 48** apresenta a disposição das concentrações correspondentes para o biofertilizante a cada poço da microplaca, bem como para os controles positivo e negativo. A **Figura 49** apresenta os ensaios de concentração mínima inibitória no primeiro dia e após 96h.

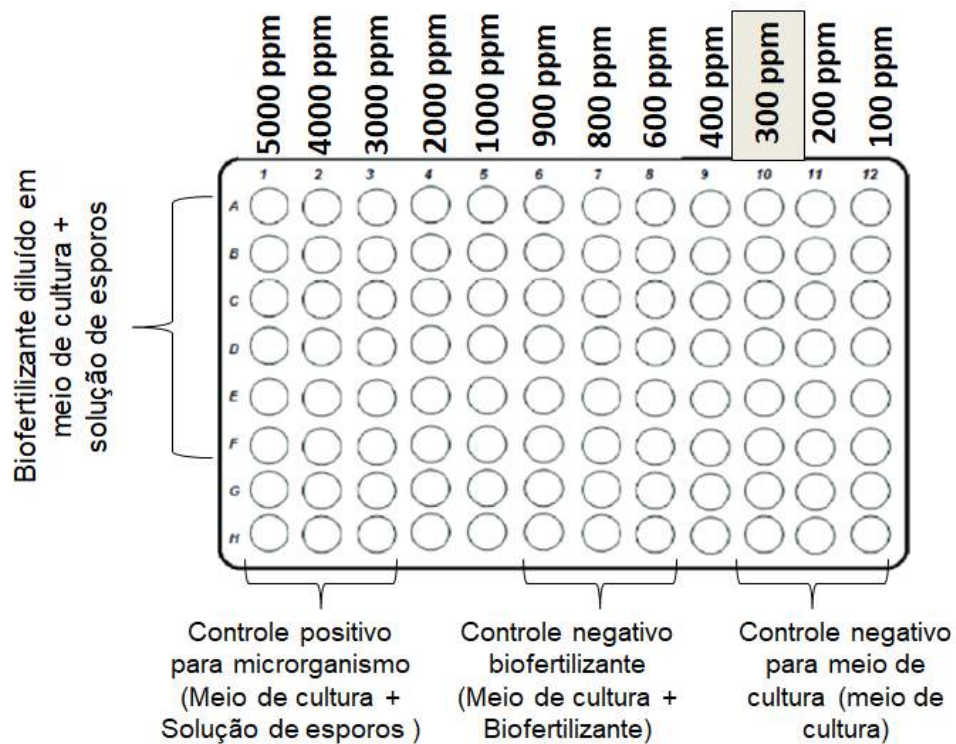


Figura 48. Disposição para as concentrações de biofertilizante utilizadas no experimento de concentração mínima inibitória. O valor de concentração, em destaque, representa a concentração de aplicação do biofertilizante indicada pelo fabricante.

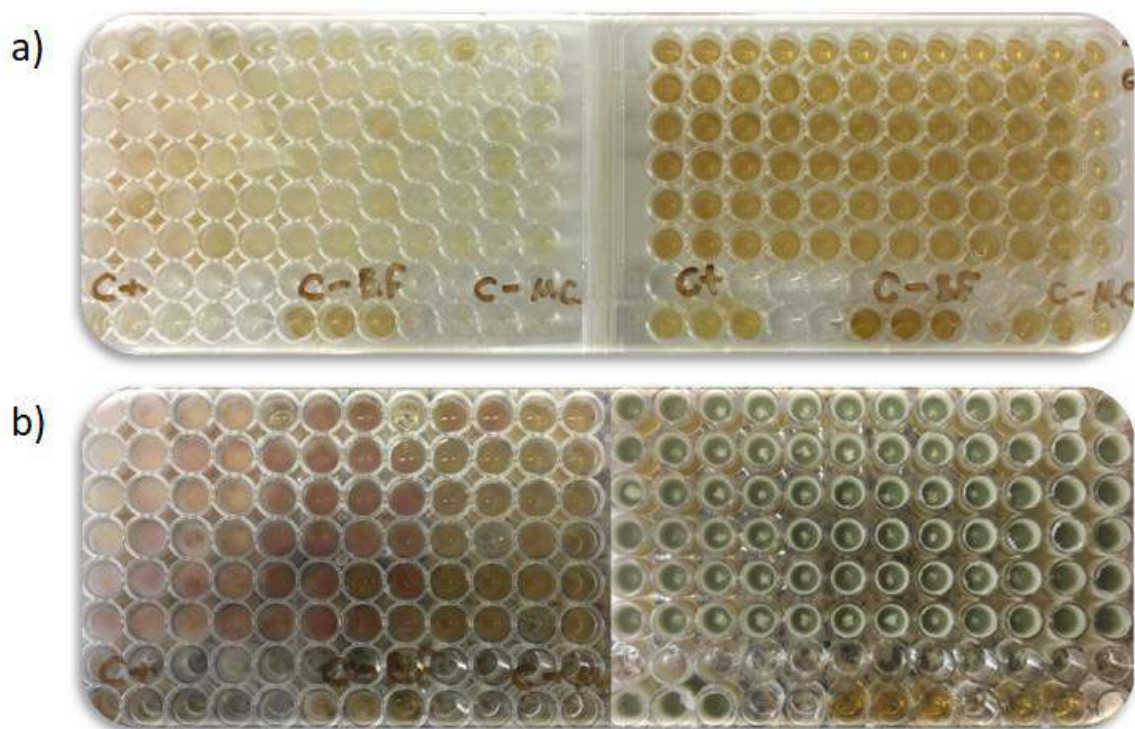


Figura 49. Placas de 96 poços dos ensaios de concentração mínima inibitória para os fungos *F. graminearum* (esquerda) e *P. digitatum* (direita) **a)** Primeiro dia da inoculação das soluções de esporos **b)** Após 96h inoculação das soluções de esporos.

Doenças causadas por fungos podem acometer plantas e plantações inteiras, causando enormes prejuízos para as atividades agrícolas e comprometendo a produção de alimentos (BENGYELLA *et al.*, 2017). Neste contexto, uma possível ação antifúngica do biofertilizante em estudo poderia figurar como uma medida alternativa ao uso de fungicidas além de ser capaz de agregar valor ao produto.

Apesar de terem sido anotados compostos que apresentaram ação antifúngica em outras espécies de fungos em sua composição (MONTAGNER *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2020), os resultados apresentados na Figura 49 indicam que a aplicação direta de soluções de biofertilizante Vorax[®], em quaisquer das concentrações utilizadas no experimento, não impediu o crescimento dos fungos *F. graminearum* e *P. digitatum*.

4.7 Atividade Antiproliferativa do biofertilizante Vorax[®]

Após 48 horas de exposição, o biofertilizante Vorax[®] não afetou a proliferação (proliferação $\geq 75\%$) dos queratinócitos humanos imortalizados HaCat (Figura 50), independente da concentração avaliada. Como esperado, o quimioterápico Doxorrubicina inibiu, de maneira diretamente proporcional, a proliferação das células HaCat.

As avaliações *in vitro* permitem a triagem simultânea de um grande número de moléculas possibilitando a redução do uso de animais tanto para as avaliações de eficiência farmacológica quanto segurança de uso (RUSSO *et al.*, 2019). No entanto, é preciso ter em mente que a avaliação do efeito sobre a proliferação celular é uma avaliação alvo-dirigida (MULLER e MILTON, 2012). Ou seja, o resultado obtido para o biofertilizante Vorax[®] indicou a baixa probabilidade de interação deste biofertilizante com tecidos que normalmente estão em processo de duplicação celular nos mamíferos, tais como pele, mucosas e medula óssea.

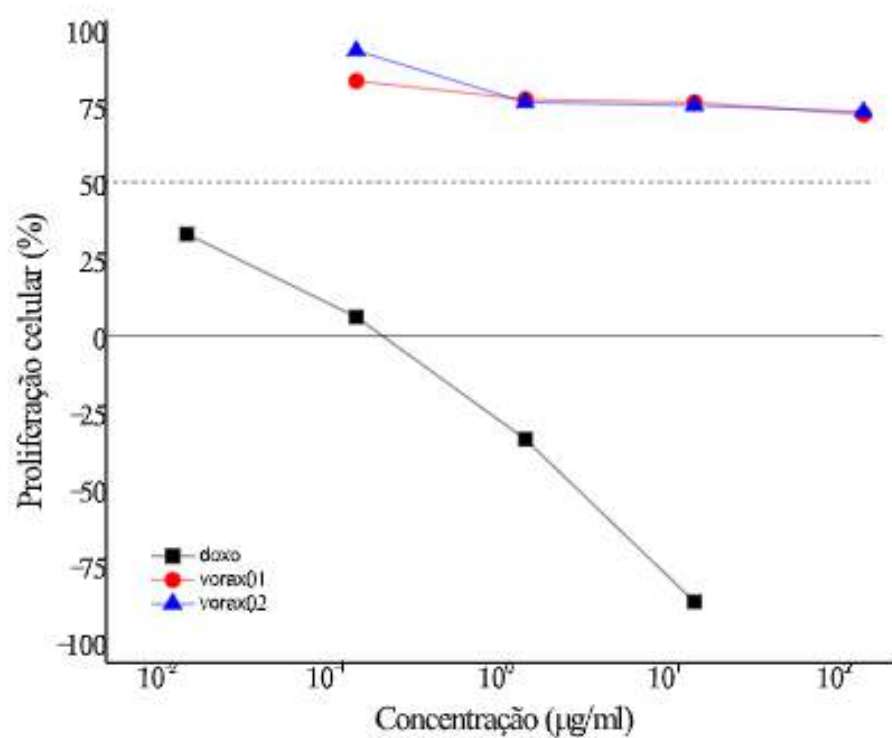


Figura 50. Influência do biofertilizante Vorax® (linhas azul e vermelha) e do quimioterápico Doxorrubicina (linha preta) sobre a proliferação de queratinócitos humanos imortalizados HaCat após 48 horas de exposição.

5. Conclusão

Como conclusões gerais destaca-se a grande diversidade de metabólitos naturais detectados no biofertilizante Vorax[®], o que pode contribuir para a ativação de diferentes rotas metabólicas importantes, desde a produção fotossintética até àquelas relacionadas ao combate a estresses bióticos e abióticos. Evidenciou-se, também, a presença de alguns metabólitos que apresentaram bioatividade, como alguns ácidos graxos poliinsaturados e a citocinina isopenteniladenina, sendo estes responsáveis por alterações significativas apresentadas nos ensaios de germinação de sementes e aplicação foliar, respectivamente. Para mais, o biofertilizante não apresentou atividade antiproliferativa, nas concentrações analisadas, frente às células humanas estudadas, o que prospecta uma maior segurança para quem o manusear. Assim, o estudo contribui de maneira efetiva para estimular um fortalecimento na promoção do produto como uma opção viável e segura, que gera uma maior produtividade do setor agrícola e um menor impacto ambiental. Foi visto, no entanto, que o produto não substitui o uso de agentes fungicidas.

As análises realizadas até aqui abrem caminho para estudos mais aprofundados acerca da composição do produto de modo que mais metabólitos possam ser anotados e identificados. As várias classes químicas anotadas sugerem a possibilidade de que outros metabólitos estejam presentes e atuem de maneira a contribuir para aumentar a produtividade das plantas submetidas a tratamentos com o biofertilizante Vorax[®].

6. Referências

AGRIBUSINESS INTELLIGENCE. Biofertilisers 2019 Definitions and types; Global and Country Sales; Crop Applications; Regulations; R&D; Future Prospects. 2019.

AKHTAR, S. S.; MEKUREYAW, M. F.; PANDEY, C.; ROITSCH, T.. Role of Cytokinins for Interactions of Plants With Microbial Pathogens and Pest Insects. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 10, p. 1-12, 19 fev. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.01777>.

ALI, S.; GEDAILY, R. E.; MOCAN, A.; FARAG, M.; EL-SEEDI, H.. Profiling Metabolites and Biological Activities of Sugarcane (*Saccharum officinarum* Linn.) Juice and its Product Molasses via a Multiplex Metabolomics Approach. **Molecules**, [S.L.], v. 24, n. 5, p. 934, 7 mar. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24050934>.

AMPOFO, J. O.; NGADI, M.. Stimulation of the phenylpropanoid pathway and antioxidant capacities by biotic and abiotic elicitation strategies in common bean (*Phaseolus vulgaris*) sprouts. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 100, p. 98-106, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.027>.

ANGELINI, P.; MATEI, F.; FLORES, G. A.; PELLEGRINO, R. M.; VUGUZIGA, L.; VENANZONI, R.; TIRILLINI, B.; EMILIANI, C.; ORLANDO, G.; MENGHINI, L.. Metabolomic Profiling, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Bidens pilosa*. **Processes**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 903, 21 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pr9060903>.

ANSARI, M. F.; TIPRE, D. R.; DAVE, S. R.. Efficiency evaluation of commercial liquid biofertilizers for growth of *Cicer aeritinum* (chickpea) in pot and field study. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 17-24, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.09.010>.

ARAÚJO, E. V.; VENDRAMINI, P. H.; COSTA, J. H.; EBERLIN, M. N.; MONTAGNER, C. C.; FILL, T. P.. Determination of tryptoquialanines A and C produced by *Penicillium digitatum* in oranges: are we safe?. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 301, p. 125285, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125285>.

AZIZ, N. G. A.; ABDEL-SHAFY, H.; LEILA, B. H. A.. Chemical Constituents, Growth and Flowering of *Coreopsis tinctoria* Nutt Plants as affected by Glutamic Acid and irrigation by different wastewater treated effluents. **Egyptian Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 60, n. 6, p. 2-5, 1 dez. 2017. Egypts Presidential Specialized Council for Education and Scientific Research. <http://dx.doi.org/10.21608/ejchem.2017.1726.1145>.

BANO, A.; ULLAH, F.; NOSHEEN, A.. Role of abscisic acid and drought stress on the activities of antioxidant enzymes in wheat. **Plant, Soil And Environment**, [S.L.], v. 58, n. 4, p. 181-185, 19 abr. 2012. Czech Academy of Agricultural Sciences. <http://dx.doi.org/10.17221/210/2011-pse>.

BÄRENSTRAUCH, M.; MANN, S.; JACQUEMIN, C.; BIBI, S.; SYLLA, O.; BAUDOUIN, E.; BUISSON, D.; PRADO, S.; KUNZ, C.. Molecular crosstalk between the endophyte *Paraconiothyrium variabile* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum* – Modulation of lipoxygenase activity and beauvericin production during the interaction. **Fungal Genetics And Biology**, [S.L.], v. 139, p. 103383, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103383>.

BAYOUMI, S. A. L.; ROWAN, M. G.; BLAGBROUGH, I. S.; BEECHING, J. R.. Biosynthesis of scopoletin and scopolin in cassava roots during post-harvest physiological deterioration: the e-z-isomerisation stage. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 69, n. 17, p. 2928-2936, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.09.023>.

BENGYELLA, L.; YEKWA, E. L.; NAWAZ, K.; IFTIKHAR, S.; TAMBO, E.; ALISOLTANI, A.; FETO, N. A.; ROY, P.. Global invasive *Cochliobolus* species: cohort of destroyers with implications in food losses and insecurity in the twenty-first century. **Archives Of Microbiology**, [S.L.], v. 200, n. 1, p. 119-135, 22 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-017-1426-6>.

BENTO, H. B.; CARVALHO, A. K. F.; REIS, C. E. R.; CASTRO, H. F.. Single cell oil production and modification for fuel and food applications: assessing the potential of sugarcane molasses as culture medium for filamentous fungus. **Industrial Crops**

And Products, [S.L.], v. 145, p. 112141, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112141>.

BHARDWAJ, D.; ANSARI, M.; SAHOO, R.; TUTEJA, N.. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 66, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>.

BHATTACHARJEE, Soumen. Triadimefon pretreatment protects newly assembled membrane system and causes up-regulation of stress proteins in salinity stressed *Amaranthus lividus* L. during early germination. **Journal Of Environmental Biology**, Lucknow, v. 5, n. 29, p. 805-810, 15 maio 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto Nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004. Disponível em <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTematicaPortal&codigoTematica=1229184>>, acesso em 13/08/2020.

BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E.. Glutamate: a truly functional amino acid. **Amino Acids**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 413-418, 18 abr. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-012-1280-4>.

BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J.. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant And Soil**, [S.L.], v. 252, n. 1, p. 55-128, maio 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1024146710611>.

CAJAMARCA, S.; MARTINS, D.; SILVA, J.; FONTENELLE, M.; GUEDES, I.; FIGUEIREDO, C.; LIMA, C. P.. Heterogeneity in the Chemical Composition of Biofertilizers, Potential Agronomic Use, and Heavy Metal Contents of Different Agro-Industrial Wastes. **Sustainability**, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 1995, 3 abr. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/su11071995>.

CANUTO, G.; COSTA, J. L.; CRUZ, P.; SOUZA, A.; FACCIO, A.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K.; TAVARES, M.. METABOLÔMICA: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, [S.L.], p. 75-91, 2017. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170134>

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo. PIB do agronegócio brasileiro, 2020. Disponível em < <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx> >, acesso em 14/08/2020.

CHANDLER, D.; BAILEY, A. S.; TATCHELL, G. M.; DAVIDSON, G.; GREAVES, J.; GRANT, W. P.. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [S.L.], v. 366, n. 1573, p. 1987-1998, 12 jul. 2011. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>.

CHAUDHARY, B. M.; VARMA, L. R.; MORE, S. G.; ACHARYA, M. D.; RABARI, S. S.. Effect of biofertilizers and different sources of organic manures on growth parameters and yield attributes of amaranth (*Amaranthus Spp.*) Cv. Arka Suguna. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6 n.3, p. 166-171. 2018.

CHAUDHARY, S.; DHERI, G.; BRAR, B.. Long-term effects of NPK fertilizers and organic manures on carbon stabilization and management index under rice-wheat cropping system. **Soil And Tillage Research**, [S.L.], v. 166, p. 59-66, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2016.10.005>.

CHENG, F.; YU, H.; STEPHANOPOULOS, G.. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for high-titer biosynthesis of hyaluronic acid. **Metabolic Engineering**, [S.L.], v. 55, p. 276-289, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2019.07.003>.

CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S.. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 72, p. 1-20, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>.

CHRZĄSZCZ, M.; KRZEMIŃSKA, B.; CELIŃSKI, R.; SZEWCZYK, K.. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Plants Belonging to the *Cephalaria* (*Caprifoliaceae*) Genus. **Plants**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 952, 11 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants10050952>.

CORTLEVEN, A.; LEUENDORF, J. E.; FRANK, M.; PEZZETTA, D.; BOLT, S.; SCHMÜLLING, T.. Cytokinin action in response to abiotic and biotic stresses in plants. **Plant, Cell & Environment**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 998-1018, 19 fev. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pce.13494>.

CORTLEVEN, A.; NITSCHKE, S.; KLAUMÜNZER, M.; ABDELGAWAD, H.; ASARD, H.; GRIMM, B.; RIEFLER, M.; SCHMÜLLING, T.. A Novel Protective Function for Cytokinin in the Light Stress Response Is Mediated by the ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2 and ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE3 Receptors . **Plant Physiology**, [S.L.], v. 164, n. 3, p. 1470-1483, 14 jan. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.113.224667>.

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E.. BIOSYNTHESIS AND ACTION OF JASMONATES IN PLANTS. **Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 355-381, jun. 1997. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.355>.

CUTLER, S. R.; RODRIGUEZ, P. L.; FINKELSTEIN, R. R.; ABRAMS, S. R.. Absciscic Acid: emergence of a core signaling network. **Annual Review Of Plant Biology**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 651-679, 2 jun. 2010. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>.

CZÉGÉNY, G.; KÖRÖSI, L.; STRID, Å.; HIDEK, E.. Multiple roles for Vitamin B6 in plant acclimation to UV-B. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-9, 4 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-38053-w>.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 185-201, 1 fev. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-013-1325-z>.

DESEO, M. A.; ELKINS, A.; ROCHFORD, S.; KITCHEN, B.. Antioxidant activity and polyphenol composition of sugarcane molasses extract. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 314, p. 126180, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126180>.

DICKSCHAT, J. S.; WICKEL, S.; BOLTEN, C. J.; NAWRATH, T.; SCHULZ, S.; WITTMANN, C.. Pyrazine Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. **European Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 2010, n. 14, p. 2687-2695, 24 mar. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201000155>.

DIXON, R. A.; GANG, D. R.; CHARLTON, A. J.; FIEHN, O.; KUIPER, H. A.; REYNOLDS, T. L.; TJEERDEMA, R. S.; JEFFERY, E. H.; GERMAN, J. B.; RIDLEY, W. P.. Applications of Metabolomics in Agriculture. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 54, n. 24, p. 8984-8994, 1 nov. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf061218t>.

DOTANIYA, M. L.; DATTA, S. C.; BISWAS, D. R.; DOTANIYA, C. K.; MEENA, B. L.; RAJENDIRAN, S.; REGAR, K. L.; LATA, M.. Use of sugarcane industrial by-products for improving sugarcane productivity and soil health. **International Journal Of Recycling Of Organic Waste In Agriculture**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 185-194, 29 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40093-016-0132-8>.

DWEBBA, C. C.; FIGLAN, S.; SHIMELIS, H. A.; MOTAUNG, T.; SYDENHAM, S.; MWADZINGENI, L.; TSILO, T. J.. Fusarium head blight of wheat: pathogenesis and control strategies. **Crop Protection**, [S.L.], v. 91, p. 114-122, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.002>.

EGGELING, L.; BOTT, M.. **Handbook of Corynebacterium glutamicum**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2005.

EL-RHEEM, K. M. A.; ZAGHLOUL, S. M.; YASSEN, A. A.; EL-ASHRY, S. M.. Effect of glutamic acid and N fertilization levels on growth, yield and nutrients content of wheat plants. **World Wide Journal Of Multidisciplinary Research And Development**, El-Dokki, Giza, v. 2, n. 7, p. 10-13, fev. 2021.

EMBRAPA. Agência de Informação Embrapa. Produção e uso de biofertilizantes em sistemas de produção de base ecológica, 2009. Disponível em < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/30920/1/Circular-78.pdf> >, acesso em 13/08/2020.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Retrato do Brasil Rural de 1950 e 1960, 2018. Disponível em < <https://www.embrapa.br/visao/trajetoria-da-agricultura-brasileira#:~:text=A%20agricultura%20brasileira%20era%20rudimentar,trabalho%20bra%C3%A7al%20na%20produ%C3%A7%C3%A3o%20agropecu%C3%A1ria.&text=Uso%20de%20m%C3%A1quinas%20agr%C3%ADcolas%20estava%20restrito%20a%202%25%20das%20fazendas> >, acesso em 13/08/2020.

ENOMOTO, H.; MIYAMOTO, K.. Unique localization of jasmonic acid-related compounds in developing *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) seeds revealed through desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 188, p. 112812, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112812>.

ERNST, M.; KANG, K. B.; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; NOTHIAS, L.; WANDY, J.; CHEN, C.; WANG, M.; ROGERS, S.; MEDEMA, M. H.; DORRESTEIN, P. C.. MolNetEnhancer: enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. **Metabolites**, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 144, 16 jul. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/metabo9070144>.

FAO. The future of food and agriculture - Trends and challenges. p.46, 2017

FERNÁNDEZ, V.; EICHERT, T.. Uptake of Hydrophilic Solutes Through Plant Leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. **Critical Reviews In Plant Sciences**, [S.L.], v. 28, n. 1-2, p. 36-68, 19 mar. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07352680902743069>.

FERNÁNDEZ, V.; SOTIROPOULOS, T.; BROWN, P.. **Adubação Foliar: fundamentos científicos e técnicas de campo** – São Paulo: Abisolo, 2015.

FEUNANG, Y. D.; EISNER, R.; KNOX, C.; CHEPELEV, L.; HASTINGS, J.; OWEN, G.; FAHY, E.; STEINBECK, C.; SUBRAMANIAN, S.; BOLTON, E.. ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. **Journal Of Cheminformatics**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-20, 4 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13321-016-0174-y>.

FIEHN, O.; ROBERTSON, D.; GRIFFIN, J.; WERF, M. v. D.; NIKOLAU, B.; MORRISON, N.; SUMNER, L. W.; GOODACRE, R.; HARDY, N. W.; TAYLOR, C.. The metabolomics standards initiative (MSI). **Metabolomics**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 175-178, 17 ago. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-007-0070-6>.

FRANZONI, G.; COCETTA, G.; FERRANTE, A.. Effect of glutamic acid foliar applications on lettuce under water stress. **Physiology And Molecular Biology Of Plants**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 1059-1072, 22 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12298-021-00984-6>.

FRÉBORTOVÁ, J.; FRÉBORT, I.. Biochemical and Structural Aspects of Cytokinin Biosynthesis and Degradation in Bacteria. **Microorganisms**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 1314, 16 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9061314>.

FUENTES-RAMIREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J.. Bacterial Biofertilizers. **Pgpr: Biocontrol and Biofertilization**, [S.L.], p. 143-172, 2005. Springer-Verlag. http://dx.doi.org/10.1007/1-4020-4152-7_5.

GÖBEL, C.; FEUSSNER, I.. Methods for the analysis of oxylipins in plants. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 70, n. 13-14, p. 1485-1503, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.040>.

GODZIEN, J.; LAFUENTE, A. G.; OTERO, A.; BARBAS, C.. Metabolite Annotation and Identification. **Comprehensive Analytical Chemistry**, [S.L.], p. 415-445, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.coac.2018.07.004>.

GRABARCZYK, M.; WIŃSKA, K.; MAŁCZKA, W.; POTANIEC, B.; ANIOŁ, M.. Loliolide - the most ubiquitous lactone. **Folia Biologica Et Oecologica**, [S.L.], v. 11, p. 1-8, 30 dez. 2015. Uniwersytet Łódzki (University of Lodz). <http://dx.doi.org/10.1515/fobio-2015-0001>

GRASSI, G.; HOUSE, J.; DENTENER, F.; FEDERICI, S.; DENËELZEN, M.; PENMAN, J.. The key role of forests in meeting climate targets requires science for credible mitigation. **Nature Climate Change**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 220-226, 27 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nclimate3227>.

GUO, Y.; GAN, S.. Translational researches on leaf senescence for enhancing plant productivity and quality. **Journal Of Experimental Botany**, [S.L.], v. 65, n. 14, p. 3901-3913, 16 jun. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eru248>.

HEIDER, S. A.; PETERS-WENDISCH, P.; WENDISCH, V. F.. Carotenoid biosynthesis and overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. **Bmc Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 198, 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-198>.

HENKE, N. A.; HEIDER, S. A. E.; HANNIBAL, S.; WENDISCH, V. F.; PETERS-WENDISCH, P.. Isoprenoid Pyrophosphate-Dependent Transcriptional Regulation of Carotenogenesis in *Corynebacterium glutamicum*. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 8, p. 1-15, 24 abr. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00633>.

HERMANN, T.. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. **Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 104, n. 1-3, p. 155-172, set. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(03\)00149-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(03)00149-4).

HLOPHE, N. P.; AREMU, A. O.; GRUZ, J.; VAN STADEN, J.; FINNIE, J. F.. Influence of different cytokinins on the phenolic acids and antioxidant activity of two *Brachystelma* species. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture (Pctoc)**, [S.L.], v. 145, n. 3, p. 689-699, 27 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-021-02038-x>.

HLUSKA, T.; HLUSKOVÁ, L.; EMERY, R. J. N.. The Hulks and the Deadpools of the Cytokinin Universe: a dual strategy for cytokinin production, translocation, and signal transduction. **Biomolecules**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 209-247, 3 fev. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom11020209>.

HOFIUS, D.; BÖRNKE, F. A. J.. Photosynthesis, carbohydrate metabolism and source–sink relations. **Potato Biology And Biotechnology**, [S.L.], p. 257-285, 2007. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-044451018-1/50055-5>

HÖNIG, M.; PLÍHALOVÁ, L.; HUSIČKOVÁ, A.; NISLER, J.; DOLEŽAL, K.. Role of Cytokinins in Senescence, Antioxidant Defence and Photosynthesis. **International**

Journal Of Molecular Sciences, [S.L.], v. 19, n. 12, p. 4045, 14 dez. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19124045>.

HOOFT, J. J. J. v. D.; WANDY, J.; BARRETT, M. P.; BURGESS, K. E. V.; ROGERS, S.. Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 113, n. 48, p. 13738-13743, 16 nov. 2016. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1608041113>.

HOU, X.; LI, Y.; SHI, Y.; FANG, Y.; CHAO, R.; GU, Y.; WANG, C.; SHAO, C.. Integrating Molecular Networking and ¹H NMR To Target the Isolation of Chrysogeamides from a Library of Marine-Derived Penicillium Fungi. **The Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 84, n. 3, p. 1228-1237, 4 jan. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.8b02614>.

HUSSAIN, M. M.; TAHIA, F.; A RASHID, M.. Secondary Metabolites from Some Species of Albizzia: a review. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-8, 10 ago. 2016. Bangladesh Journals Online (JOL). <http://dx.doi.org/10.3329/bpj.v19i1.29228>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro v.30 n.12 p.1-82, 2017.

IPCC. Fifth Assessment Report. Working Group III. Mitigation of Climate Change. Capítulo 11. Agriculture, Forestry and other Land Use (AFOLU). p. 11, 2014.

JAMIR, L.; KUMAR, V.; KAUR, J.; KUMAR, S.; SINGH, H.. Composition, valorization and therapeutical potential of molasses: a critical review. **Environmental Technology Reviews**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 131-142, 1 jan. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21622515.2021.1892203>.

KANNAN, S.. Foliar Fertilization for Sustainable Crop Production. **Genetic Engineering, Biofertilisation, Soil Quality And Organic Farming**, [S.L.], p. 371-402, 2010. Springer Netherlands. http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-8741-6_13.

KAUSHAL, S.; RANA, R.; KUMAR, S.; KUMAR, R.. Foliar Feeding of Plant Nutrients. **Popular Kheti**, Palampur, v. 2, n. 2, p. 76-81, abr. 2014

KEEREETAWEEP, J.; BLANCAFLOR, E. B.; HORNING, E.; FEUSSNER, I.; CHAPMAN, K. D.. Lipoxygenase-derived 9-hydro(pero)xides of linoleoylethanolamide interact with ABA signaling to arrest root development during Arabidopsis seedling establishment. **The Plant Journal**, [S.L.], v. 82, n. 2, p. 315-327, abr. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12821>.

KHAN, M. N.; HAQ, F. U.; RAHMAN, S.; ALI, A.; MUSHARRAF, S. G.. Metabolite distribution and correlation studies of Ziziphus jujuba and Ziziphus nummularia using LC-ESI-MS/MS. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 178, p. 112918, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112918>.

KIND, T.; FIEHN, O.. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. **Bmc Bioinformatics**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-20, 27 mar. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-8-105>.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; JANDRLIĆ, M.. Influence of media and temperature on gliotoxin production in Aspergillus fumigatus strains. **Arh Hig Rada Toksikol**, [S.L.], v. 56, p.269-73. set. 2005

KRUBASIK, P.; KOBAYASHI, M.; SANDMANN, G.. Expression and functional analysis of a gene cluster involved in the synthesis of decaprenoxanthin reveals the mechanisms for C50carotenoid formation. **European Journal Of Biochemistry**, [S.L.], v. 268, n. 13, p. 3702-3708, 1 jul. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02275.x>.

LALOUE, M.; TERRINE, C.; GUERN, J.. Cytokinins: metabolism and biological activity of n6-(δ^2 -isopentenyl)adenosine and n6-(δ^2 -isopentenyl)adenine in tobacco cells and callus. **Plant Physiology**, [S.L.], v. 59, n. 3, p. 478-483, 1 mar. 1977. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.59.3.478>.

LAZAR, A. G.; ROMANCIUC, F.; SOCACIU, M. A.; SOCACIU, C.. Bioinformatics Tools for Metabolomic Data Processing and Analysis Using Untargeted Liquid Chromatography Coupled With Mass Spectrometry. **Bulletin Of University Of Agricultural Sciences And Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science And Biotechnologies**, [S.L.], v. 72, n. 2, p. 103-115, 20 out. 2015. AcademicPres (EAP) Publishing House. <http://dx.doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:11536>.

LEE, H. J.; LEE, J. H.; WI, S.; JANG, Y.; AN, S.; CHOI, C. K.; JANG, S.. Exogenously applied glutamic acid confers improved yield through increased photosynthesis efficiency and antioxidant defense system under chilling stress condition in *Solanum lycopersicum* L. cv. Dotaerang Dia. **Scientia Horticulturae**, [S.L.], v. 277, p. 109817, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109817>.

LEE, J.; NA, Y.; KIM, E.; LEE, H.; KIM, P.. The Actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an Industrial Workhorse. **Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 807-822, 28 maio 2016. Korean Society for Microbiology and Biotechnology. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1601.01053>.

LI, S.; ZHAO, X.; YE, X.; ZHANG, L.; SHI, L.; XU, F.; DING, G.. The Effects of Condensed Molasses Soluble on the Growth and Development of Rapeseed through Seed Germination, Hydroponics and Field Trials. **Agriculture**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 260, 2 jul. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/agriculture10070260>.

LIU, X.; JI, D.; CUI, X.; ZHANG, Z.; LI, B.; XU, Y.; CHEN, T.; TIAN, S.. *p*-Coumaric acid induces antioxidant capacity and defense responses of sweet cherry fruit to fungal pathogens. **Postharvest Biology And Technology**, [S.L.], v. 169, p. 111297, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111297>.

MAHANTY, T.; BHATTACHARJEE, S.; GOSWAMI, M.; BHATTACHARYYA, P.; DAS, B.; GHOSH, A.; TRIBEDI, P.. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 3315-3335, 26 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>.

MAYNARD, D.; GRÖGER, H.; DIERKS, T.; DIETZ, K.. The function of the oxylipin 12-oxophytodienoic acid in cell signaling, stress acclimation, and development. **Journal Of Experimental Botany**, [S.L.], p. 5341-5354, 31 ago. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ery316>.

MAZHER, A. A. M.; ZAGHLOUL, S. M.; MAHMOUD, S. A.; SIAM, H. S.. Stimulatory Effect of Kinetin, Ascorbic acid and Glutamic Acid on Growth and Chemical Constituents of *Codiaeum variegatum* L. Plants. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.**, Dokki, Giza, v. 3, n. 10, p. 318-323, jan. 2011.

MELAMUD, E.; VASTAG, L.; RABINOWITZ, J. D.. Metabolomic Analysis and Visualization Engine for LC-MS Data. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 82, n. 23, p. 9818-9826, dez. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac1021166>.

MESQUITA, F. R.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, A. F. B.. Linhagens de feijão (*phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, [S.L.], v. 31, n. 4, p. 1114-1121, ago. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-70542007000400026>.

MICROQUÍMICA TRADECORP. Vorax Biofertilizante, 2021. Disponível em < <https://microquimicatradecorp.com/product/vorax-biofertilizante.1h.html> >, acesso em 05/06/2021.

MILANI, G. L.; OLIVEIRA, J. A.; SILVA, L. H. C.; VON PINHO, E. V. R.; GUIMARÃES, R. M.. Nodulação e desenvolvimento de plantas oriundas de sementes de soja teores de molibdênio. **Revista Brasileira de Sementes**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 19-27, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-31222008000200003>.

MOHIMANI, H.; GUREVICH, A.; MIKHEENKO, A.; GARG, N.; NOTHIAS, L.; NINOMIYA, A.; TAKADA, K.; DORRESTEIN, P. C.; A PEVZNER, P.. Dereplication of peptidic natural products through database search of mass spectra. **Nature Chemical Biology**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 30-37, 31 out. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2219>.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Jnci Journal Of The National Cancer Institute**, [S.L.], v. 83, n. 11, p. 757-766, 5 jun. 1991. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/83.11.757>

MONTAGNER, C.; SOUZA, S. M. ; GROPOSO, C.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JUNIOR, A.. Antifungal Activity of Coumarins. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, [S.L.], v. 63, n. 1-2, p. 21-28, 1 fev. 2008. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/znc-2008-1-205>.

MORCOL, T. B.; WYSOCKI, K.; SANKARAN, R. P.; MATTHEWS, P. D.; KENNELLY, E. J.. UPLC-QToF-MSE Metabolomics Reveals Changes in Leaf Primary and Secondary Metabolism of Hop (*Humulus lupulus* L.) Plants under Drought Stress. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 68, n. 49, p. 14698-14708, 25 nov. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05987>.

MORDOR INTELLIGENCE, 2021. Fertilizers Market - Growth, Trends, Covid-19 Impact, And Forecasts (2021 - 2026). Disponível em < <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/fertilizers-market> >, acesso em 03/06/2021.

MORTZFELD, F. B.; HASHEM, C.; VRANKOVÁ, K.; WINKLER, M.; RUDROFF, F.. Pyrazines: synthesis and industrial application of these valuable flavor and fragrance compounds. **Biotechnology Journal**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 2000064, 14 ago. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/biot.202000064>.

MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S.. Hormonal impact on photosynthesis and photoprotection in plants. **Plant Physiology**, [S.L.], v. 185, n. 4, p. 1500-1522, 13 jan. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/plphys/kiaa119>.

MULLER, P. Y.; MILTON, M. N.. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 751-761, 31 ago. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3801>.

MURATA, M.; NAKAI, Y.; KAWAZU, K.; ISHIZAKA, M.; KAJIWARA, H.; ABE, H.; TAKEUCHI, K.; ICHINOSE, Y.; MITSUHARA, I.; MOCHIZUKI, A.. Loliolide, a Carotenoid Metabolite, Is a Potential Endogenous Inducer of Herbivore Resistance. **Plant Physiology**, [S.L.], v. 179, n. 4, p. 1822-1833, 30 jan. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.18.00837>.

NADEEKA, P.; SERAN, T.. The effects of goat manure and sugarcane molasses on the growth and yield of beetroot (*Beta vulgaris* L.). **Journal Of Agricultural Sciences, Belgrade**, [S.L.], v. 65, n. 4, p. 321-335, 2020. National Library of Serbia. <http://dx.doi.org/10.2298/jas2004321n>

NASEEM, M.; WÖFLING, M.; DANDEKAR, T.. Cytokinins for immunity beyond growth, galls and green islands. **Trends In Plant Science**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 481-484, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.04.001>.

NATELLA, F.; NARDINI, M.; FELICE, M.; SCACCINI, C.. Benzoic and Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidants: structurexactivity relation. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 47, n. 4, p. 1453-1459, abr. 1999. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf980737w>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger** - 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NIELSEN, K. F.; LARSEN, T. O.. The importance of mass spectrometric dereplication in fungal secondary metabolite analysis. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 6, p. 1-15, 17 fev. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00071>.

NKOMO; GOKUL; KEYSTER; KLEIN. Exogenous p-Coumaric Acid Improves Salvia hispanica L. Seedling Shoot Growth. **Plants**, [S.L.], v. 8, n. 12, p. 546, 26 nov. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants8120546>.

NOTHIAS, L.; PETRAS, D.; SCHMID, R.; DÜHRKOP, K.; RAINER, J.; SARVEPALLI, A.; PROTSYUK, I.; ERNST, M.; TSUGAWA, H.; FLEISCHAUER, M.. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature Methods**, [S.L.], v. 17, n. 9, p. 905-908, 24 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6>.

O'CONNOR, E.. ENERGY CROPS | Biomass Production. **Encyclopedia Of Applied Plant Sciences**, [S.L.], p. 266-273, 2003. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b0-12-227050-9/00086-7>.

PADILLA-GONZÁLEZ, G. F.; SADGROVE, N. J.; CCANA-CCAPATINTA, G. V.; LEUNER, O.; FERNANDEZ-CUSIMAMANI, E.. Feature-Based Molecular Networking to Target the Isolation of New Caffeic Acid Esters from Yacon (Smallanthus sonchifolius, Asteraceae). **Metabolites**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 407, 13 out. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/metabo10100407>.

PALMONARI, A.; CAVALLINI, D.; SNIFFEN, C. J.; FERNANDES, L.; HOLDER, P.; FAGIOLI, L.; FUSARO, I.; BIAGI, G.; FORMIGONI, A.; MAMMI, L.. Short

communication: characterization of molasses chemical composition. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 103, n. 7, p. 6244-6249, jul. 2020. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-17644>.

PORCEL, R.; ZAMARREÑO, A.; GARCÍA-MINA, J.; AROCA, R.. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. **Bmc Plant Biology**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 36, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-14-36>.

PROST, I.; DHONDT, S.; ROTHE, G.; VICENTE, J.; RODRIGUEZ, M. J.; KIFT, N.; CARBONNE, F.; GRIFFITHS, G.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.; ROSAHL, S.. Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins Supports Their Involvement in Defense against Pathogens. **Plant Physiology**, [S.L.], v. 139, n. 4, p. 1902-1913, 18 nov. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.105.066274>.

PYAKUREL, A.; DAHAL, B. R.; RIJAL, S.. Effect of Molasses and Organic Fertilizer in Soil fertility and Yield of Spinach in Khotang, Nepal. **International Journal Of Applied Sciences And Biotechnology**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 49-53, 26 mar. 2019. Nepal Journals Online (JOL). <http://dx.doi.org/10.3126/ijasbt.v7i1.23301>.

QIU, X.; SUN, Y.; YE, X.; LI, Z.. Signaling Role of Glutamate in Plants. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 10, p. 2-11, 24 jan. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.01743>.

REHMAN, N. U.; ABED, R. M. M.; HUSSAIN, H.; KHAN, H. Y.; KHAN, A.; KHAN, A. L.; ALI, M.; AL-NASRI, A.; AL-HARRASI, K.; AL-RAWAHI, A. N.. Anti-proliferative potential of cyclotetrapeptides from *Bacillus velezensis* RA5401 and their molecular docking on G-Protein-Coupled Receptors. **Microbial Pathogenesis**, [S.L.], v. 123, p. 419-425, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.043>.

RÖDER, C.; MÓGOR, A. F.; SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; GEMIN, L. G.; MÓGOR, G.. Potato yield and metabolic changes by use of biofertilizer containing L-glutamic acid. **Comunicata Scientiae**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 211-218, 1 ago. 2018. Lepidus Tecnologia. <http://dx.doi.org/10.14295/cs.v9i2.2564>.

ROSER, M.; RITCHIE, H. R. - "Fertilizers". - OurWorldInData.org. Disponível em < <https://ourworldindata.org/fertilizers> >, acesso em 03/06/2021.

RUIZ-PEREZ, D.; GUAN, H.; MADHIVANAN, P.; MATHEE, K.; NARASIMHAN, G.. So you think you can PLS-DA? **Bmc Bioinformatics**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-10, dez. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-019-3310-7>.

RUSSO, D. P.; STRICKLAND, J.; KARMAUS, A. L.; WANG, W.; SHENDE, S.; HARTUNG, T.; ALEKSUNES, L. M.; ZHU, H.. Nonanimal Models for Acute Toxicity Evaluations: applying data-driven profiling and read-across. **Environmental Health Perspectives**, [S.L.], v. 127, n. 4, p. 047001, abr. 2019. Environmental Health Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp3614>.

SASAKI, Y.; ENG, T.; HERBERT, R. A.; TRINH, J.; CHEN, Y.; RODRIGUEZ, A.; GLADDEN, J.; SIMMONS, B. A.; PETZOLD, C. J.; MUKHOPADHYAY, A.. Engineering *Corynebacterium glutamicum* to produce the biogasoline isopentenol from plant biomass hydrolysates. **Biotechnology For Biofuels**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-15, 27 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-019-1381-3>.

SCHÜTZ, L.; GATTINGER, A.; MEIER, M.; MÜLLER, A.; BOLLER, T.; MÄDER, P.; MATHIMARAN, N.. Improving Crop Yield and Nutrient Use Efficiency via Biofertilization—A Global Meta-analysis. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 8, p. 1-13, 12 jan. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2017.02204>.

SENEVIRATNE, G.; WEERASEKARA, M. L. M. A. W.; KUMARESAN, D.; ZAVAHIR, J. S.. Microbial Signaling in Plant—Microbe Interactions and Its Role on Sustainability of Agroecosystems. **Agro-Environmental Sustainability**, [S.L.], p. 1-17, 2017. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-49724-2_1.

SEO, H.; KIM, S.; SAGONG, H.; SON, H. F.; JIN, K. S.; KIM, I.; KIM, K.. Structural basis for cytokinin production by LOG from *Corynebacterium glutamicum*. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-9, ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep31390>.

SHAHIDI, F.; YEO, J.. Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: a review. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 1573, 25 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19061573>.

SHARMA, A.; SHAHZAD, B.; REHMAN, A.; BHARDWAJ, R.; LANDI, M.; ZHENG, B.. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. **Molecules**, [S.L.], v. 24, n. 13, p. 2452-2474, 4 jul. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24132452>.

SHOEMAKER, R. H.. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 813-823, out. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1951>.

SILVA, R. R.; WANG, M.; NOTHIAS, L.; HOOFT, J. J. J. v. D.; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; FOX, E.; BALUNAS, M. J.; KLASSEN, J. L.; LOPES, N. P.; DORRESTEIN, P. C.. Propagating annotations of molecular networks using in silico fragmentation. **Plos Computational Biology**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 1-26, 18 abr. 2018. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006089>.

SILVA, V. C.; RODRIGUES, C. M.. Natural products: an extraordinary source of value-added compounds from diverse biomasses in brazil. **Chemical And Biological Technologies In Agriculture**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-6, 17 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40538-014-0014-0>.

SINGH, A.; LAL, U.; MUKHTAR, H.; SINGH, P.; SHAH, G.; DHAWAN, R.. Phytochemical profile of sugarcane and its potential health aspects. **Pharmacognosy Reviews**, [S.L.], v. 9, n. 17, p. 45, 2015. EManuscript Technologies. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-7847.156340>.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K.. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. **3 Biotech**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-14, 8 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-016-0586-4>.

SOLTANI, Y.. Effect of foliar application of α -tocopherol and pyridoxine on vegetative growth, flowering, and some biochemical constituents of *Calendula officinalis* L.

plants. **African Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 11, n. 56, p. 11931-11935, 12 jul. 2012. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb11.4273>

SU, J.; WANG, Q.; LI, Z.; FENG, Y.; LI, Y.; YANG, S.; FENG, Y.. Different Metabolites in the Roots, Seeds, and Leaves of *Acanthopanax senticosus* and Their Role in Alleviating Oxidative Stress. **Journal Of Analytical Methods In Chemistry**, [S.L.], v. 2021, p. 1-9, 15 abr. 2021. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2021/6628880>.

SUBBAIAH, P.V. Review on vermicompost, poultry manure, farmyard manure, biogas digest, biochar, urban compost and biofertilizers as potential alternate nutrient sources for sustainable agriculture. **International Journal of Chemical Studies**, v. 7 n.4 p.255-258, 2019.

SUMNER, L. W.; AMBERG, A.; BARRETT, D.; BEALE, M. H.; BEGER, R.; DAYKIN, C. A.; FAN, T. W.; FIEHN, O.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L.. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. **Metabolomics**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 211-221, 12 set. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>.

SWAPNIL, P.; MEENA, M.; SINGH, S. K.; DHULDHAJ, U. P.; HARISH; MARWAL, A.. Vital roles of carotenoids in plants and humans to deteriorate stress with its structure, biosynthesis, metabolic engineering and functional aspects. **Current Plant Biology**, [S.L.], v. 26, p. 100203, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100203>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal** - 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TAMOGAMI, S.; RAKWAL, R.; KODAMA, O.. Phytoalexin production by amino acid conjugates of jasmonic acid through induction of naringenin-7-O-methyltransferase, a key enzyme on phytoalexin biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.). **Febs Letters**, [S.L.], v. 401, n. 2-3, p. 239-242, 20 jan. 1997. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(96\)01482-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(96)01482-2).

TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. Y.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I.. Hormones and hormone-like substances of microorganisms: a review. **Applied**

Biochemistry And Microbiology, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 229-235, maio 2006. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s000368380603001x>.

USDA. United States Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service. Brazilian Dry Bean Production. p. 1, 2019.

USTA, C.. Microorganisms in Biological Pest Control — A Review (Bacterial Toxin Application and Effect of Environmental Factors). **Current Progress In Biological Research**, [S.L.], p. 287-317, 24 abr. 2013. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/55786>.

VAWDREY, L. L.; STIRLING, G. R.. Control of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) on tomato with molasses and other organic amendments. **Australasian Plant Pathology**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 179, 1997. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1071/ap97029>.

VESSEY, J. K.. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biofertilizers. **Plant And Soil**, [S.L.], v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1026037216893>

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; WATROUS, J.; A KAPONO, C.; LUZZATTO-KNAAN, T.. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 34, n. 8, p. 828-837, ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3597>.

WASTERACK, C.. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals Of Botany**, [S.L.], v. 100, n. 4, p. 681-697, 18 maio 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm079>.

WASTERACK, C.; FORNER, S.; STRNAD, M.; HAUSE, B.. Jasmonates in flower and seed development. **Biochimie**, [S.L.], v. 95, n. 1, p. 79-85, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.005>

WENDISCH, V. F.; BOTT, M.; KALINOWSKI, J.; OLDIGES, M.; WIECHERT, W.. Emerging *Corynebacterium glutamicum* systems biology. **Journal Of**

Biotechnology, [S.L.], v. 124, n. 1, p. 74-92, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.12.002>.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.; SCHMÜLLING, T.. Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. **The Plant Cell**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 2532-2550, 10 out. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.014928>.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 163-175, 17 jan. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.521>.

WRIGHT, A. G.; ELLIS, T. P.; ILAG, L. L.. Filtered Molasses Concentrate from Sugar Cane: natural functional ingredient effective in lowering the glycaemic index and insulin response of high carbohydrate foods. **Plant Foods For Human Nutrition**, [S.L.], v. 69, n. 4, p. 310-316, 6 nov. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-014-0446-5>.

XIA, J.; WISHART, D. S.. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols In Bioinformatics**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 1-91, set. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cpbi.11>.

YUAN, Y.; TIAN, J.; XIAO, J.; SHAO, Q.; GAO, J.. Bioactive metabolites isolated from *Penicillium* sp. YY-20, the endophytic fungus from *Ginkgo biloba*. **Natural Product Research**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 278-281, 21 out. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2013.850686>.

ZAHOOR, A.; LINDNER, S. N.; WENDISCH, V. F.. METABOLIC ENGINEERING OF *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* AIMED AT ALTERNATIVE CARBON SOURCES AND NEW PRODUCTS. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 1-11, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201210004>.

ZANARDO, D. I. L.; LIMA, R. B.; FERRARESE, M. L. L.; BUBNA, G. A.; FERRARESE-FILHO, O.. Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. **Environmental And Experimental Botany**, [S.L.], v. 66, n. 1, p. 25-30, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.014>.

7. Apêndice

A. Anotação proposta pelo GNPS dos metabólitos no biofertilizante Vorax®

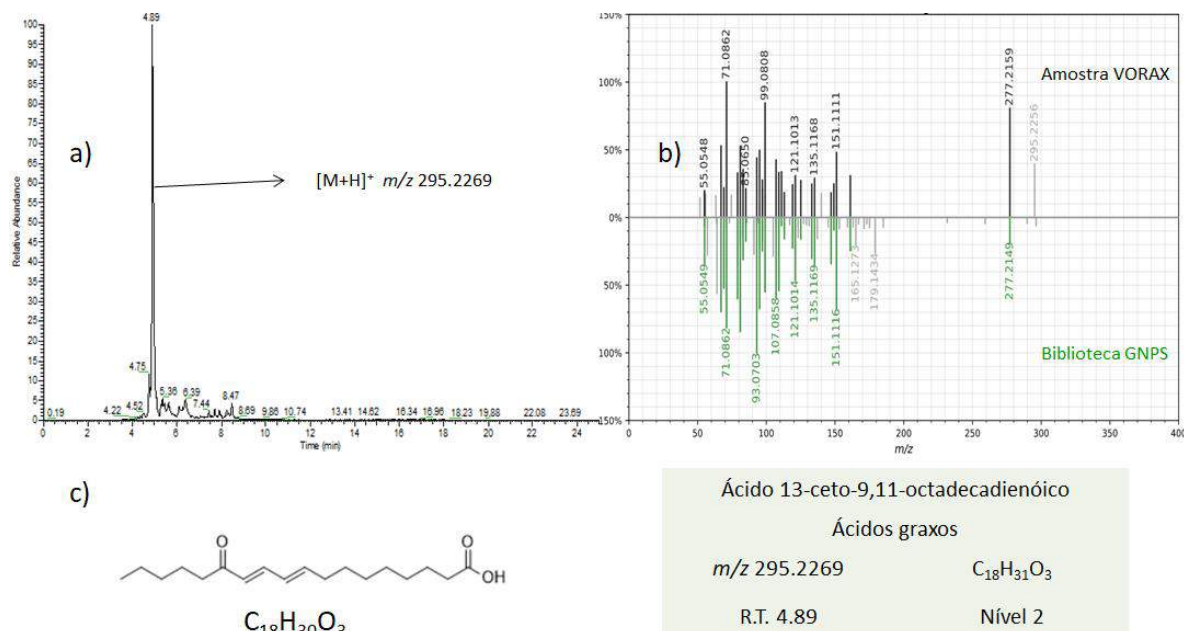


Figura A1. **a)** Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+ m/z 295.2269$, no tempo de retenção 4.89 min. **b)** *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+ m/z 295.2269$, com anotação para ácido 13-ceto-9,11-octadecadienóico. **c)** Fórmula estrutural e molecular do ácido 13-ceto-9,11-octadecadienóico.

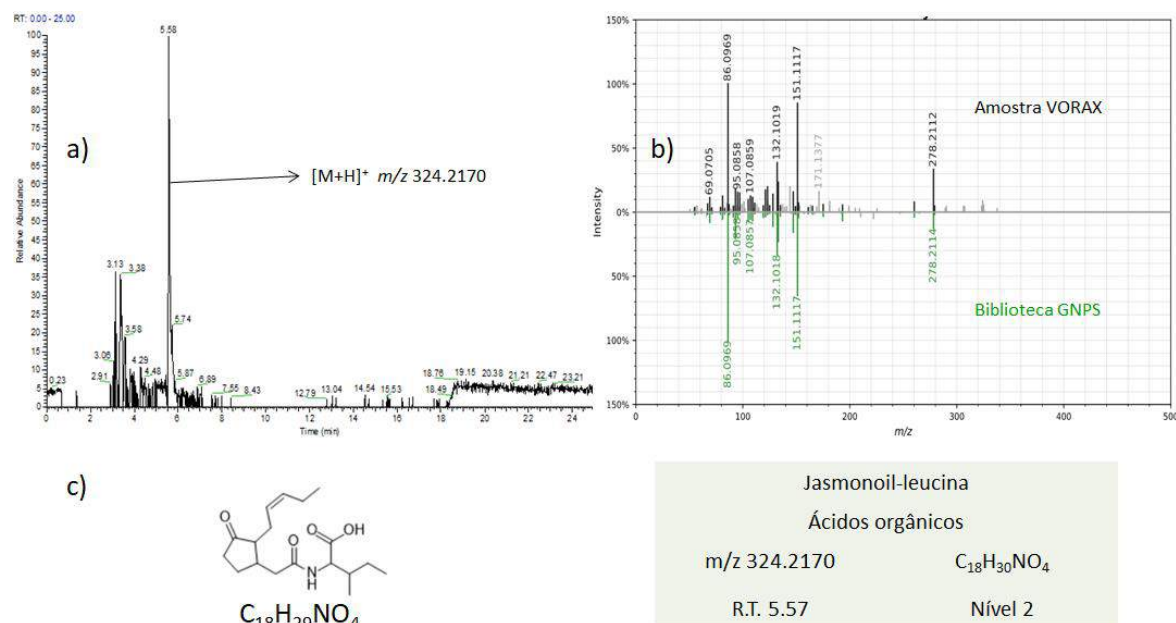


Figura A2. **a)** Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 324.2170, no tempo de retenção 5.57 min. **b)** Mirror Match do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 324.2170, com anotação para jasmonoil-leucina. Fragmentos marcados em verde correspondem a valores de íons fragmento anotados pela plataforma para estabelecer um *hit* com o metabólito anotado, de acordo com os critérios pré-estabelecidos e valores marcados em preto pertencem aos dados experimentais obtidos. **c)** Fórmula estrutural e molecular do jasmonoil-leucina.

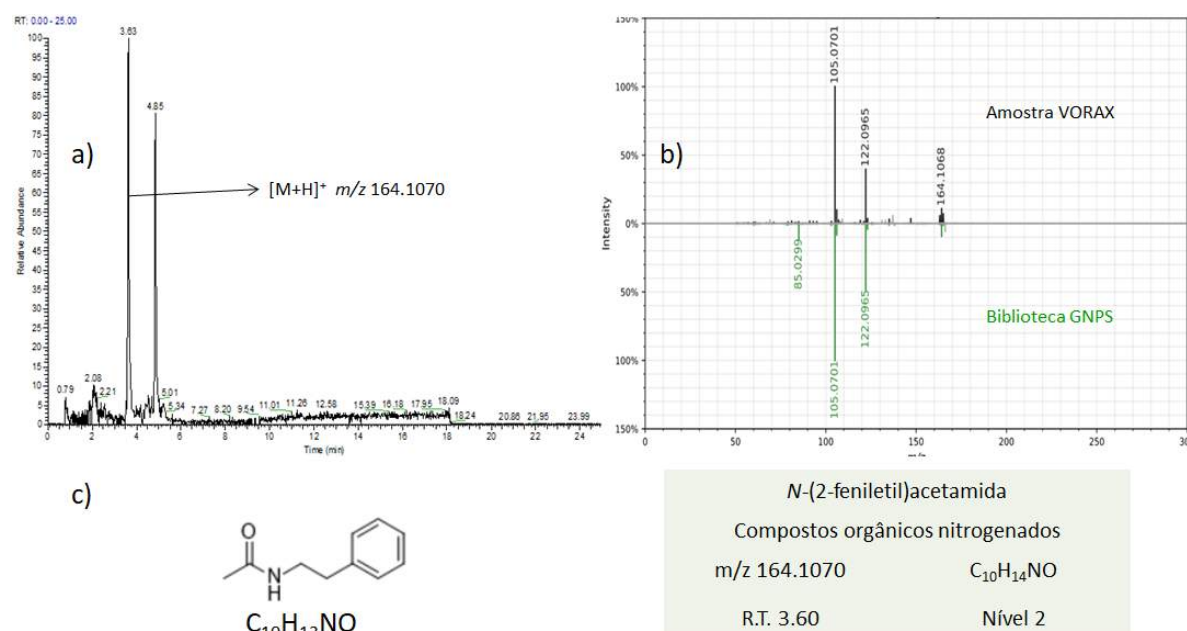


Figura A3. **a)** Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 164.1071, no tempo de retenção 3.60 min. **b)** Mirror Match do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 164.1071, com anotação para *n*-(2-feniletil)acetamida. Fragmentos marcados em verde correspondem a valores de íons fragmento anotados pela plataforma para estabelecer um *hit* com o metabólito anotado, de acordo com os critérios pré-estabelecidos e valores marcados em preto pertencem aos dados experimentais obtidos. **c)** Fórmula estrutural e molecular do *n*-(2-feniletil)acetamida.

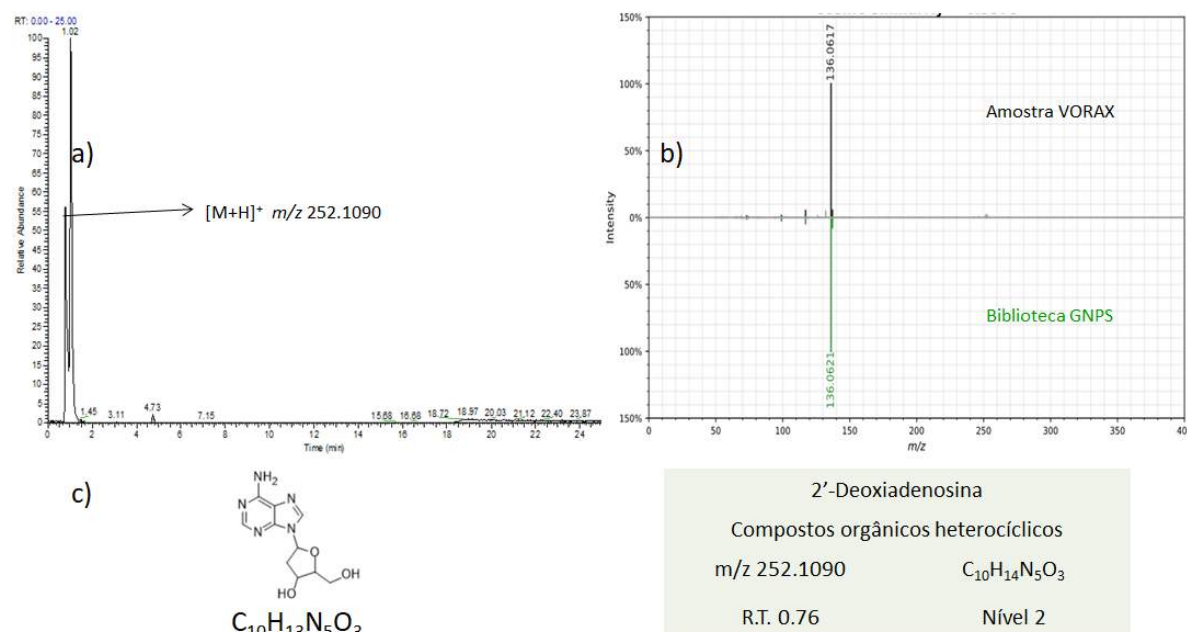


Figura A4. **a)** Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+ m/z 252.1090$, no tempo de retenção 0.76 min. **b)** *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+ m/z 252.1090$, com anotação para 2'-deoxiadenosina. Fragmentos marcados em verde correspondem a valores de íons fragmento anotados pela plataforma para estabelecer um *hit* com o metabólito anotado, de acordo com os critérios pré-estabelecidos e valores marcados em preto pertencem aos dados experimentais obtidos. **c)** Fórmula estrutural e molecular do 2'-deoxiadenosina.

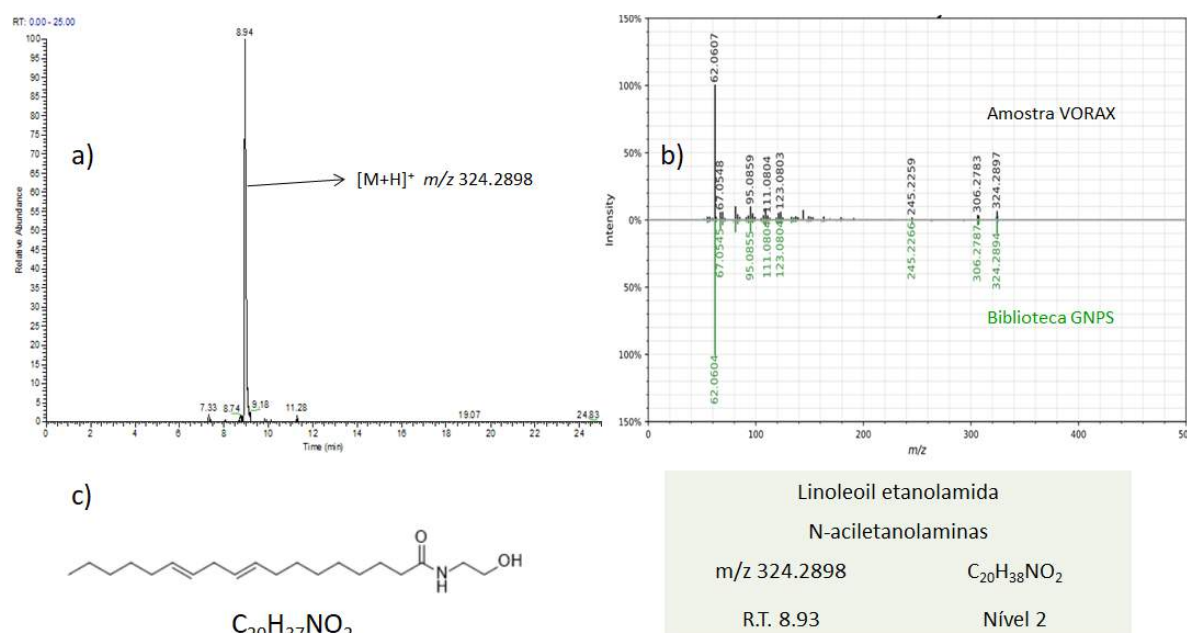


Figura A5. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 324.2898, no tempo de retenção 8.93 min. **b)** Mirror Match do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 324.2898, com anotação para linoleoil etanolamida. Fragmentos marcados em verde correspondem a valores de íons fragmento anotados pela plataforma para estabelecer um *hit* com o metabólito anotado, de acordo com os critérios pré-estabelecidos e valores marcados em preto pertencem aos dados experimentais obtidos. **c)** Fórmula estrutural e molecular do linoleoil etanolamida.

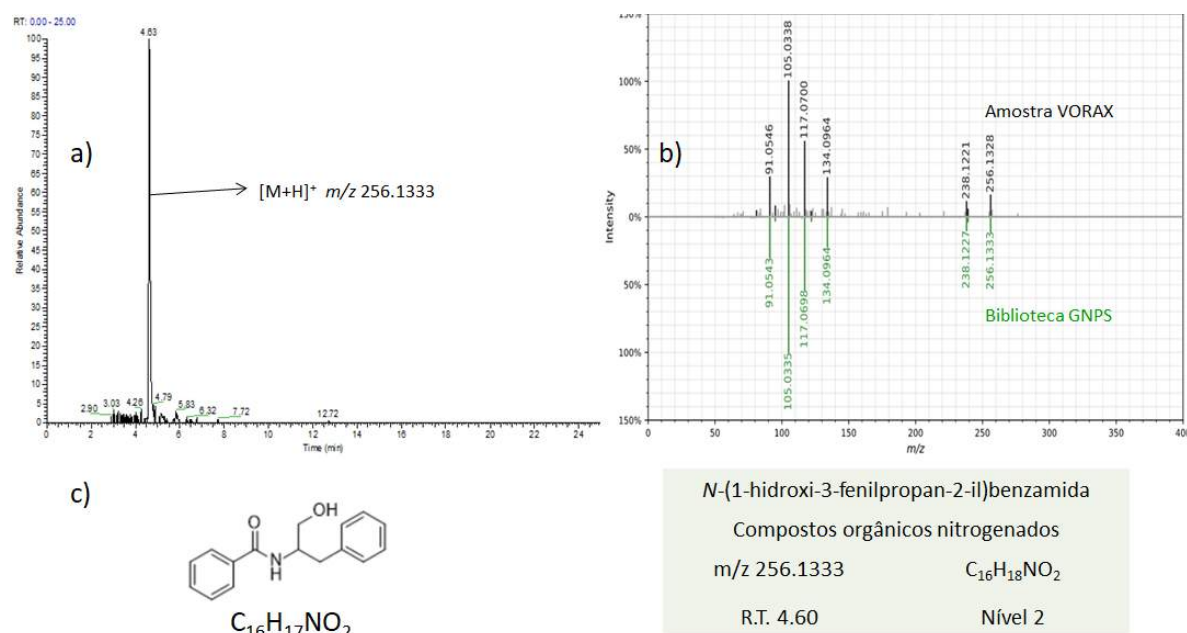


Figura A6. **a)** Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 256.1333, no tempo de retenção 4.60 min. **b)** *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 256.1333, com anotação para *n*-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)benzamida. Fragmentos marcados em verde correspondem a valores de íons fragmento anotados pela plataforma para estabelecer um *hit* com o metabólito anotado, de acordo com os critérios pré-estabelecidos e valores marcados em preto pertencem aos dados experimentais obtidos. **c)** Fórmula estrutural e molecular do *n*-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)benzamida.

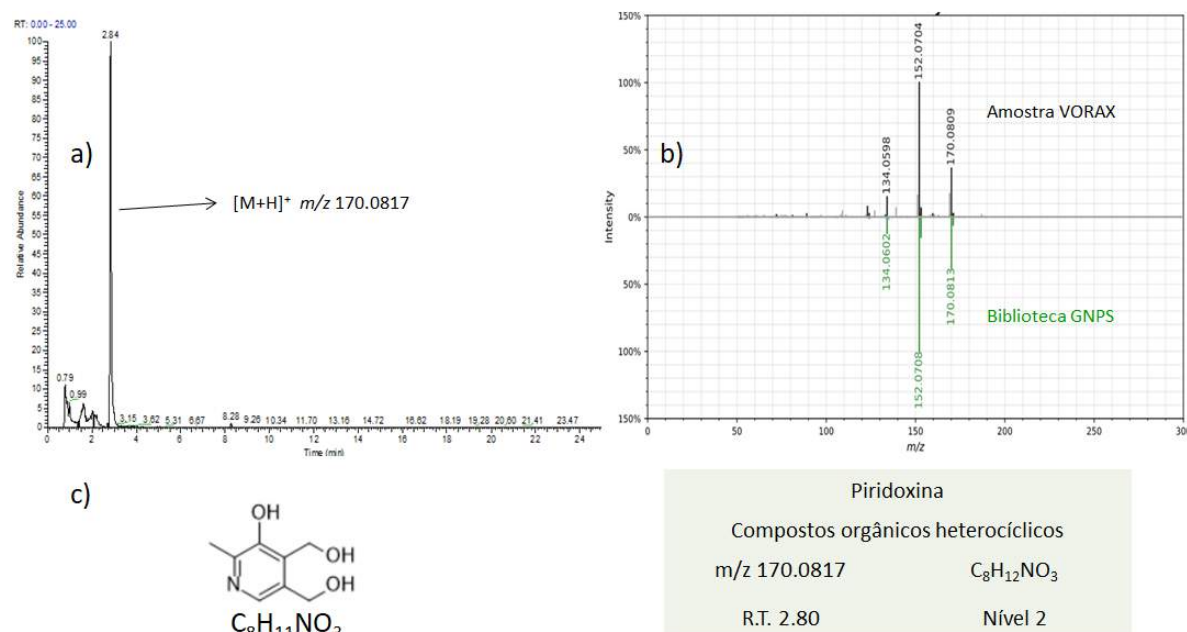


Figura A7. **a)** Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 170.0817, no tempo de retenção 2.80 min. **b)** *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 170.0817, com anotação para piridoxina. Fragmentos marcados em verde correspondem a valores de íons fragmento anotados pela plataforma para estabelecer um *hit* com o metabólito anotado, de acordo com os critérios pré-estabelecidos e valores marcados em preto pertencem aos dados experimentais obtidos. **c)** Fórmula estrutural e molecular da piridoxina.

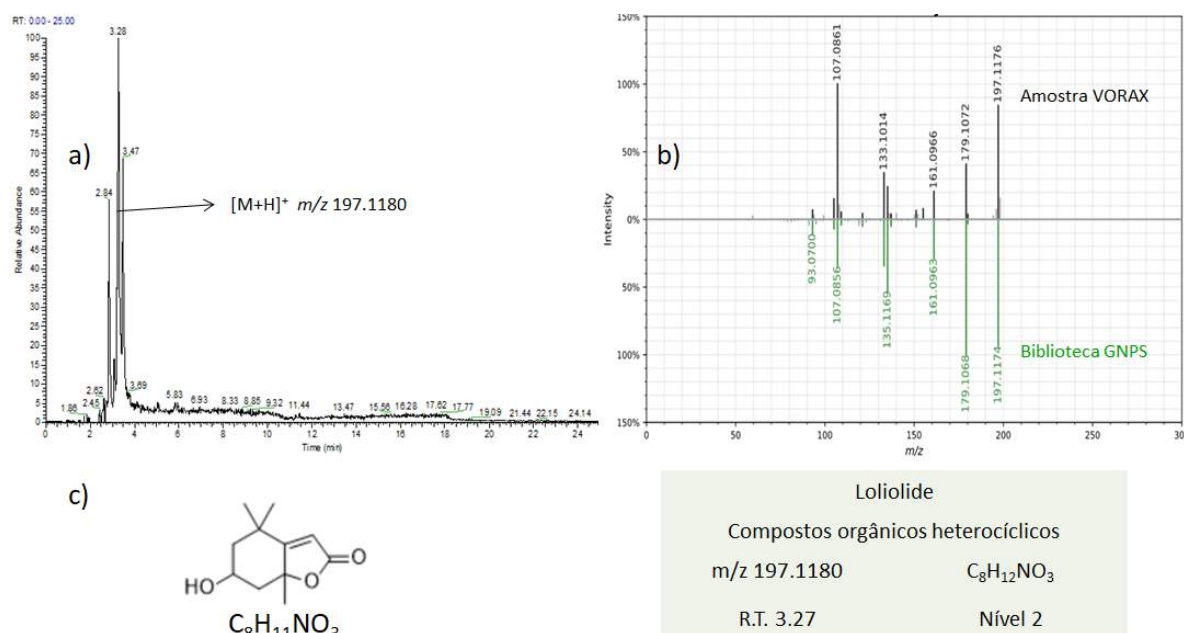


Figura A8. **a)** Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 197.1180, no tempo de retenção 3.27 min. **b)** Mirror Match do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 197.1180, com anotação para loliolide. Fragmentos marcados em verde correspondem a valores de íons fragmento anotados pela plataforma para estabelecer um *hit* com o metabólito anotado, de acordo com os critérios pré-estabelecidos e valores marcados em preto pertencem aos dados experimentais obtidos. **c)** Fórmula estrutural e molecular do loliolide.

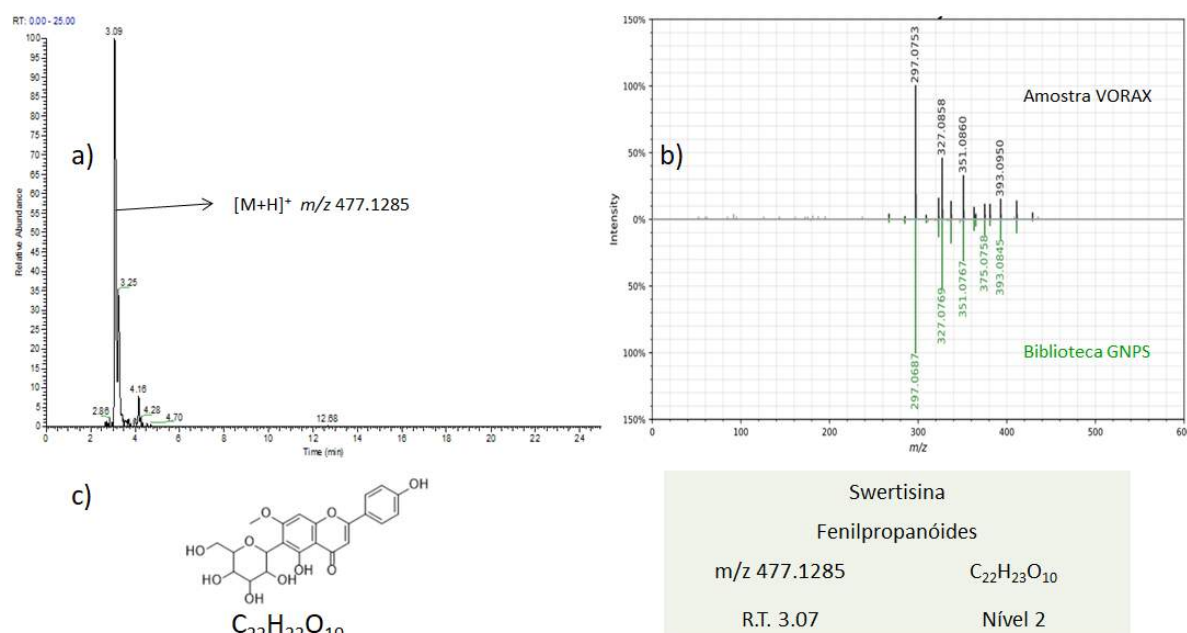


Figura A9. **a)** Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 477.1285, no tempo de retenção 3.07 min. **b)** Mirror Match do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 477.1285, com anotação para swertisina. Fragmentos marcados em verde correspondem a valores de íons fragmento anotados pela plataforma para estabelecer um *hit* com o metabólito anotado, de acordo com os critérios pré-estabelecidos e valores marcados em preto pertencem aos dados experimentais obtidos. **c)** Fórmula estrutural e molecular da swertisina.

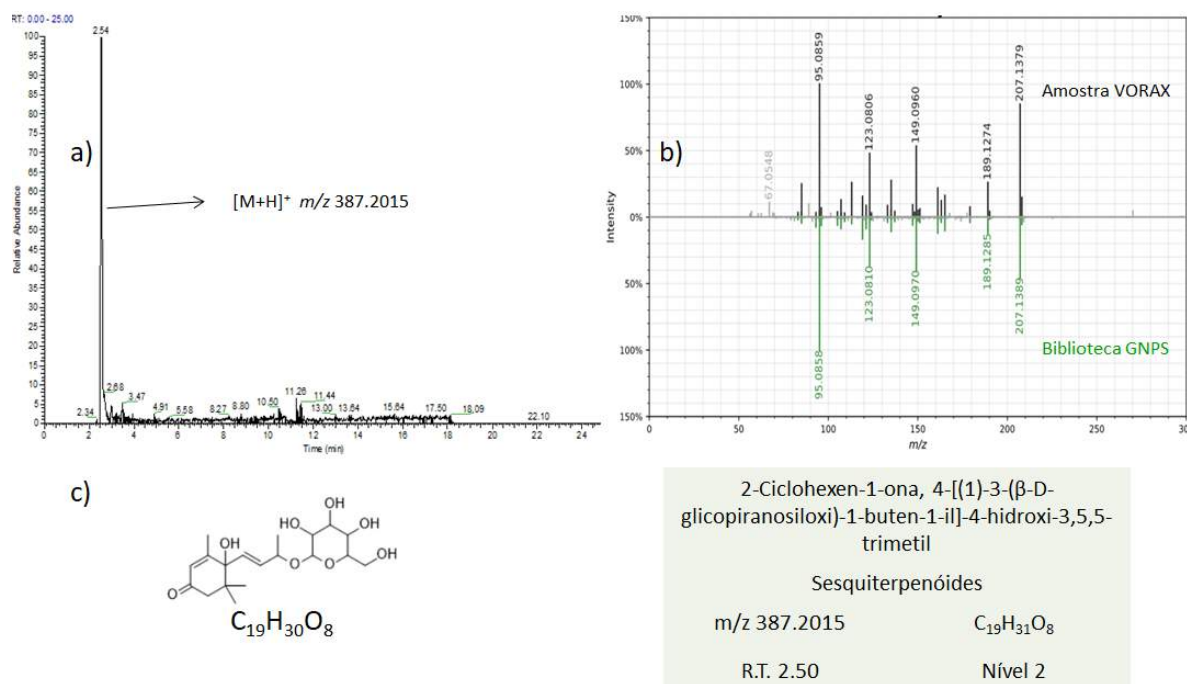


Figura A10. **a)** Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 387.2015, no tempo de retenção 2.50 min. **b)** *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 387.2015, com anotação para 2-ciclohexen-1-ona, 4-[(1)-3-(β -D-glicopiranosiloxi)-1-buten-1-il]-4-hidroxi-3,5,5-trimetil. Fragmentos marcados em verde correspondem a valores de íons fragmento anotados pela plataforma para estabelecer um *hit* com o metabólito anotado, de acordo com os critérios pré-estabelecidos e valores marcados em preto pertencem aos dados experimentais obtidos. **c)** Fórmula estrutural e molecular da 2-ciclohexen-1-ona, 4-[(1)-3-(β -D-glicopiranosiloxi)-1-buten-1-il]-4-hidroxi-3,5,5-trimetil.

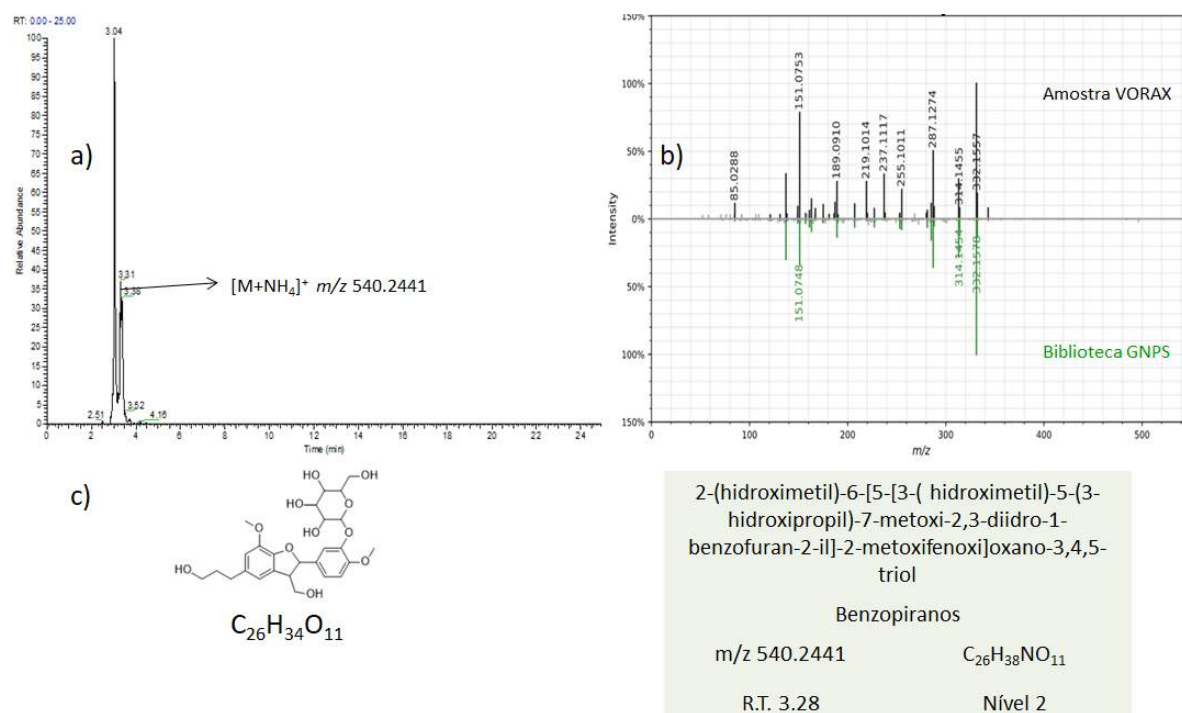


Figura A11. **a)** Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+$ m/z 540.2441, no tempo de retenção 3.28 min. **b)** *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+$ m/z 540.2441, com anotação para 2-(hidroximetil)-6-[5-[3-(hidroximetil)-5-(3-hidroxipropil)-7-metoxi-2,3-diidro-1-benzofuran-2-il]-2-metoxifenoxi]oxano-3,4,5-triol. Fragmentos marcados em verde correspondem a valores de íons fragmento anotados pela plataforma para estabelecer um *hit* com o metabólito anotado, de acordo com os critérios pré-estabelecidos e valores marcados em preto pertencem aos dados experimentais obtidos. **c)** Fórmula estrutural e molecular do 2-(hidroximetil)-6-[5-[3-(hidroximetil)-5-(3-hidroxipropil)-7-metoxi-2,3-diidro-1-benzofuran-2-il]-2-metoxifenoxi]oxano-3,4,5-triol.

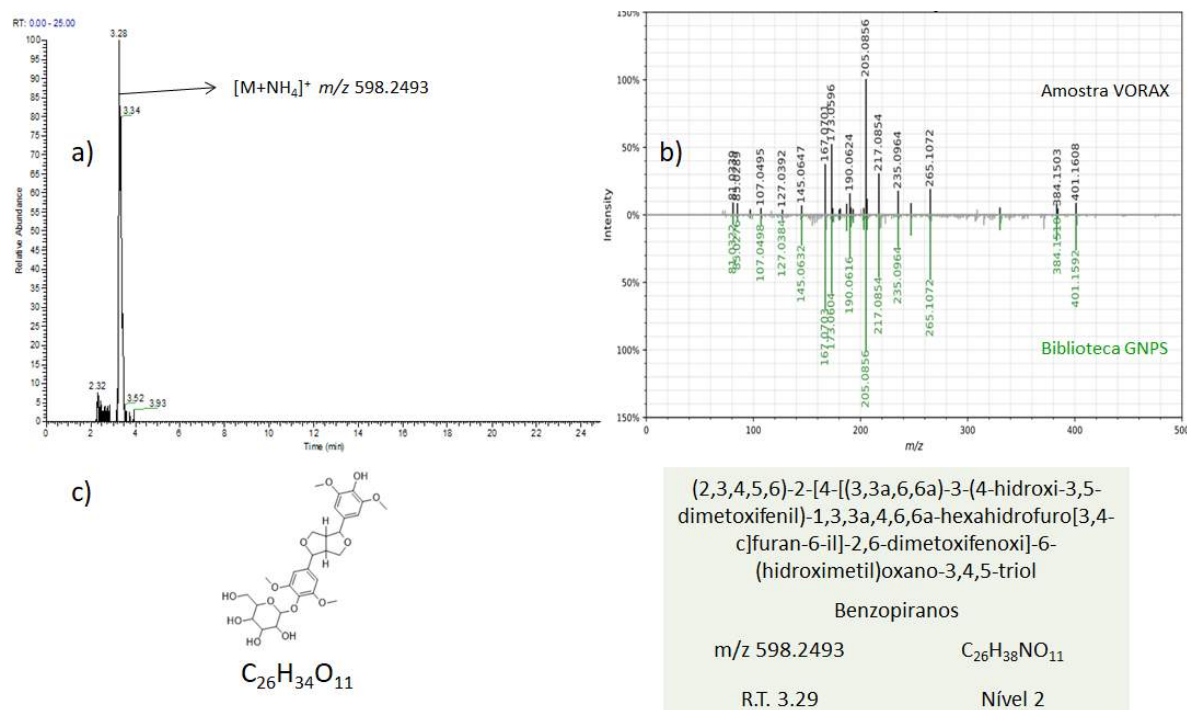


Figura A12. a) Cromatograma de íons extraídos para o íon $[M+H]^+ m/z 598.2493$, no tempo de retenção 3.29 min. **b)** *Mirror Match* do GNPS para o íon $[M+H]^+ m/z 598.2493$, com anotação para (2,3,4,5,6)-2-[4-[(3,3a,6,6a)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrofuro[3,4-c]furan-6-il]-2,6-dimetoxifenoxi]-6-(hidroximetil)oxano-3,4,5-triol.

Fragmentos marcados em verde correspondem a valores de íons fragmento anotados pela plataforma para estabelecer um *hit* com o metabólito anotado, de acordo com os critérios pré-estabelecidos e valores marcados em preto pertencem aos dados experimentais obtidos. **c)** Fórmula estrutural e molecular do (2,3,4,5,6)-2-[4-[(3,3a,6,6a)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrofuro[3,4-c]furan-6-il]-2,6-dimetoxifenoxi]-6-(hidroximetil)oxano-3,4,5-triol.

B. Anotação para os metabólitos presentes na tabela de VIP scores do PLS-DA.

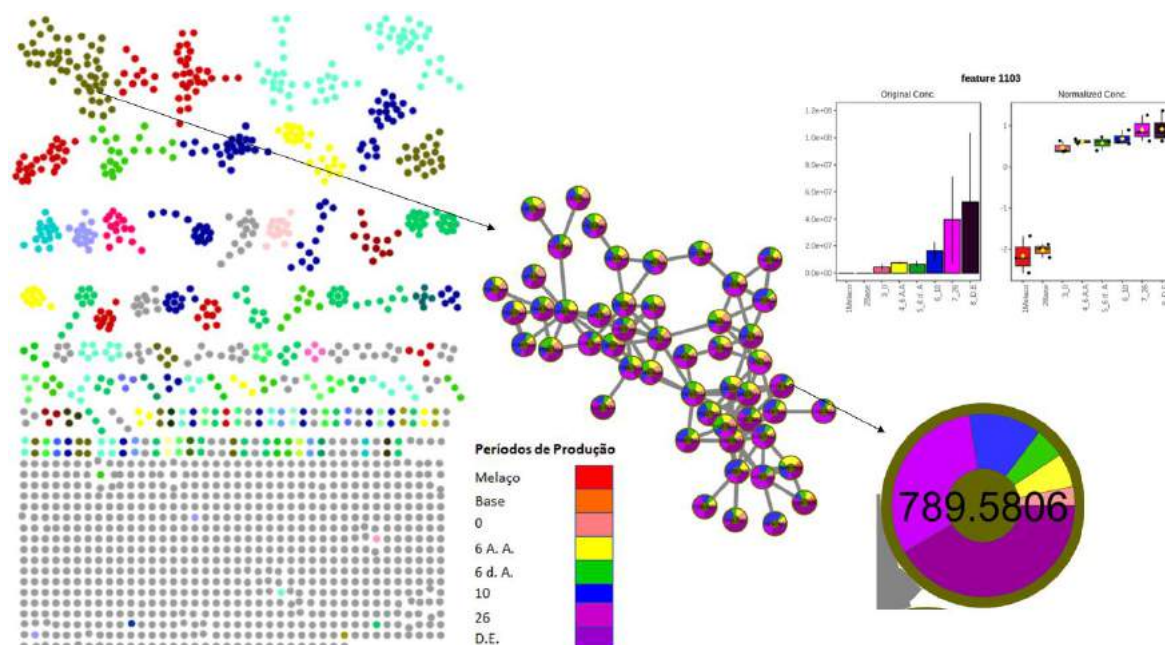


Figura B1. Feature 1103 (m/z 789.5806) presente na tabela de VIP scores do PLS-DA, com proposta de anotação nível 3 para a classe dos terpenóides.

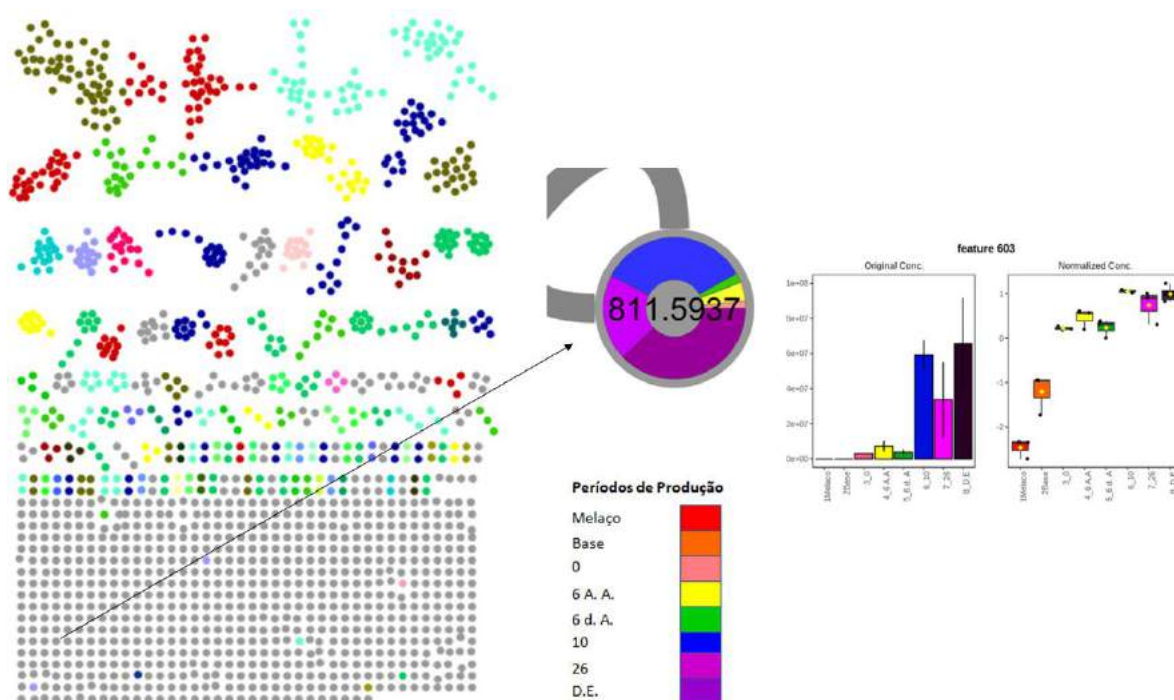


Figura B2. Feature 603 (m/z 811.5937) presente na tabela de VIP scores do PLS-DA, com proposta de anotação nível 4.

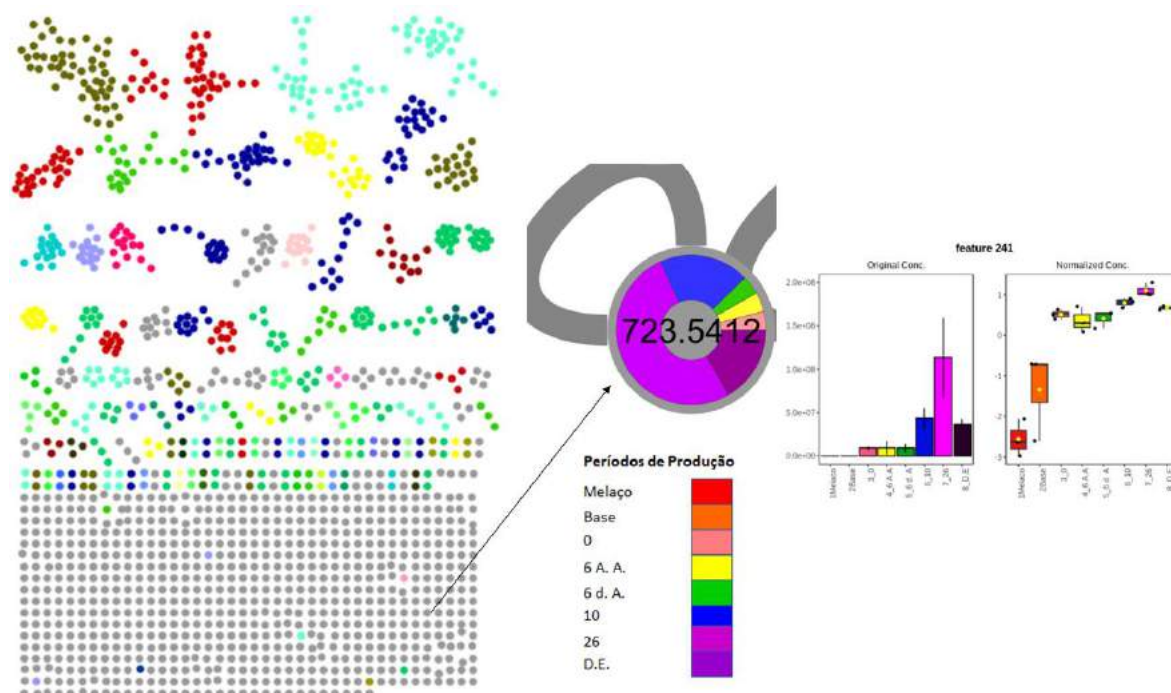


Figura B3. Feature 241 (m/z 723.5412) presente na tabela de VIP scores do PLS-DA, com proposta de anotação nível 4.

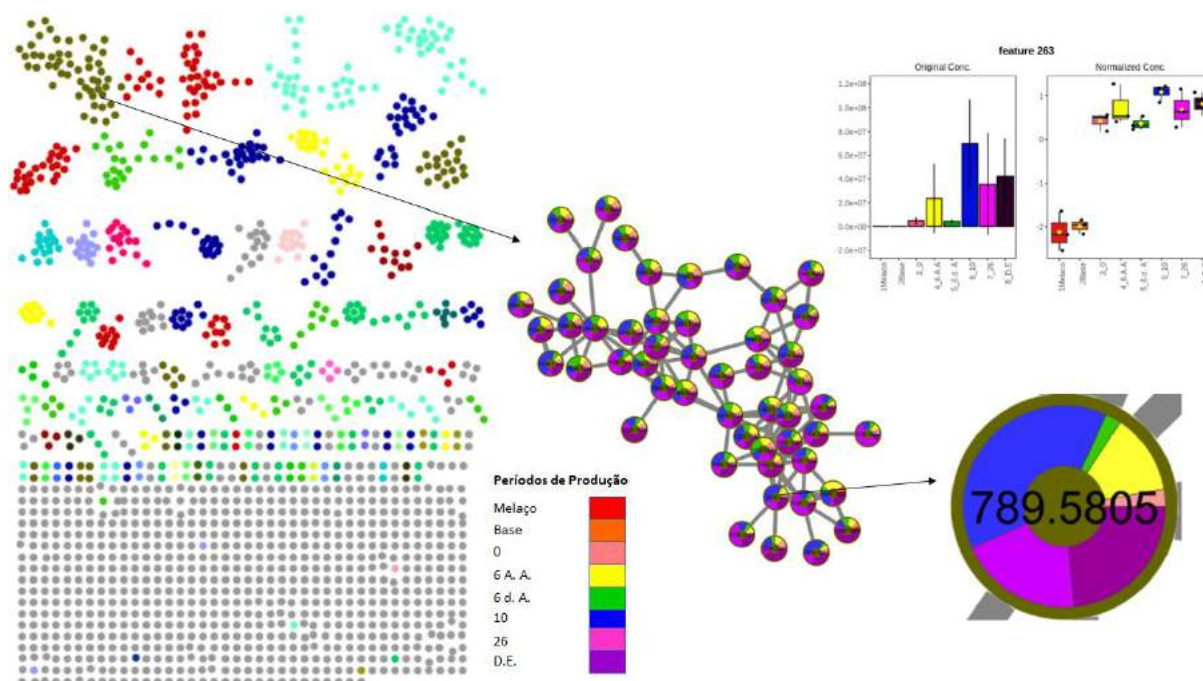


Figura B4. Feature 263 (m/z 789.5805) presente na tabela de VIP scores do PLS-DA, com proposta de anotação nível 3 para a classe dos terpenóides.

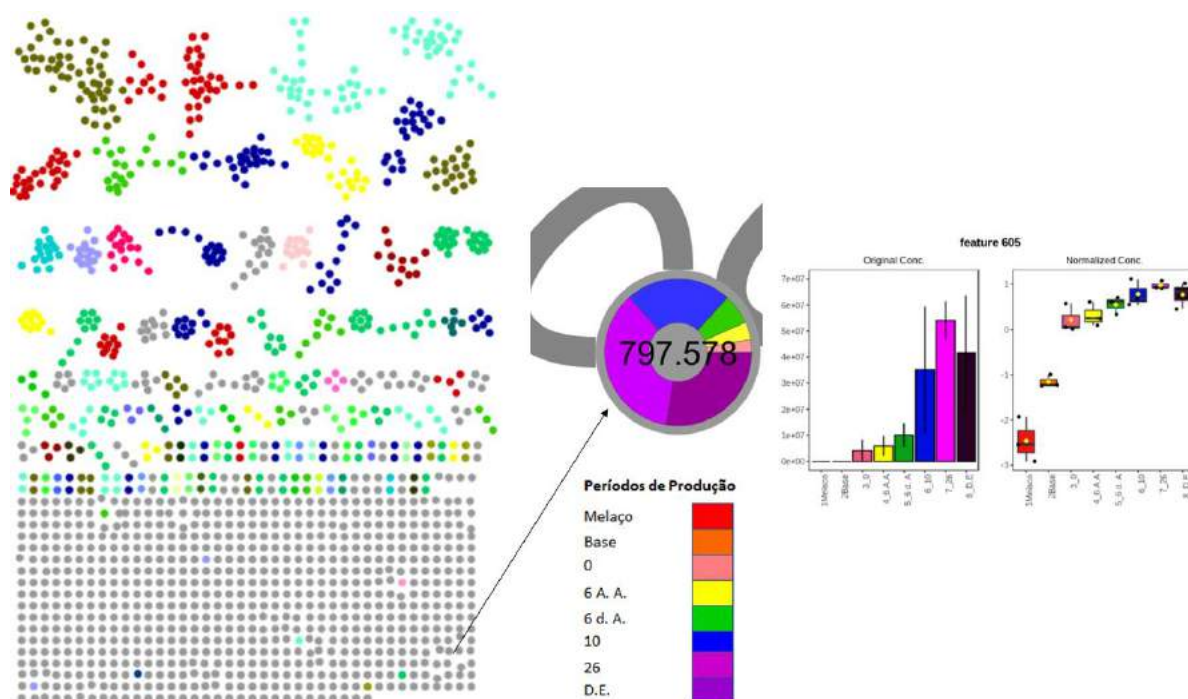


Figura B5. Feature 605 (m/z 797.578) presente na tabela de VIP scores do PLS-DA, com proposta de anotação nível 4.

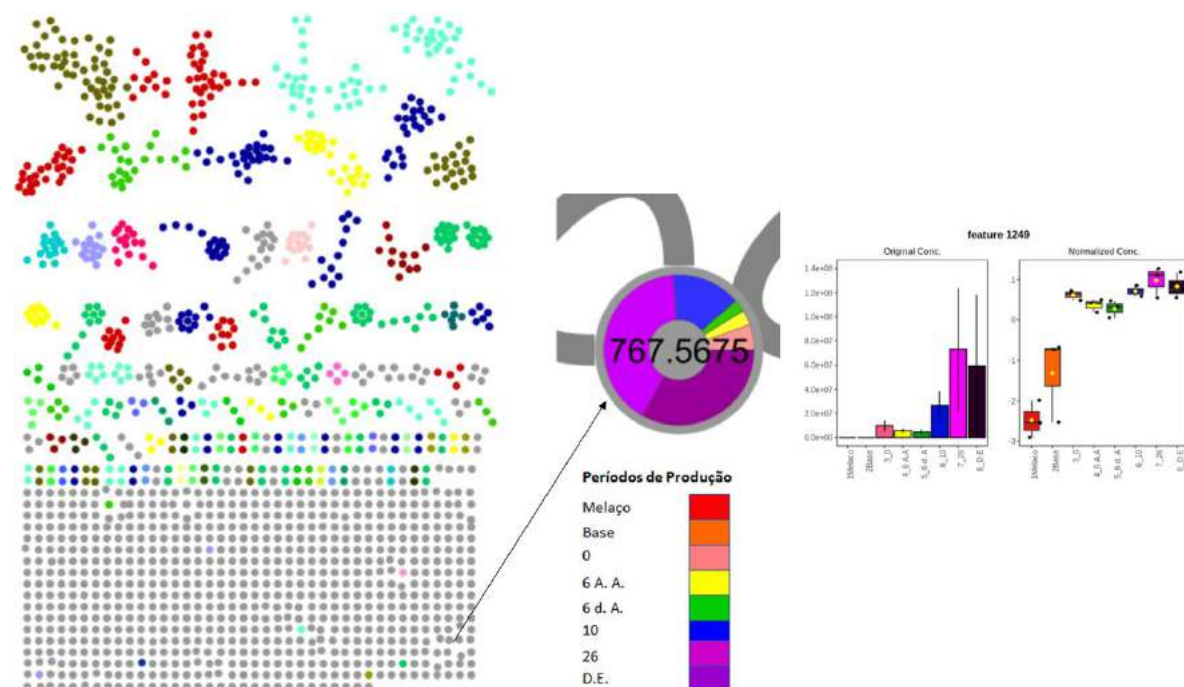


Figura B6. Feature 1249 (m/z 767.5675) presente na tabela de VIP scores do PLS-DA, com proposta de anotação nível 4.

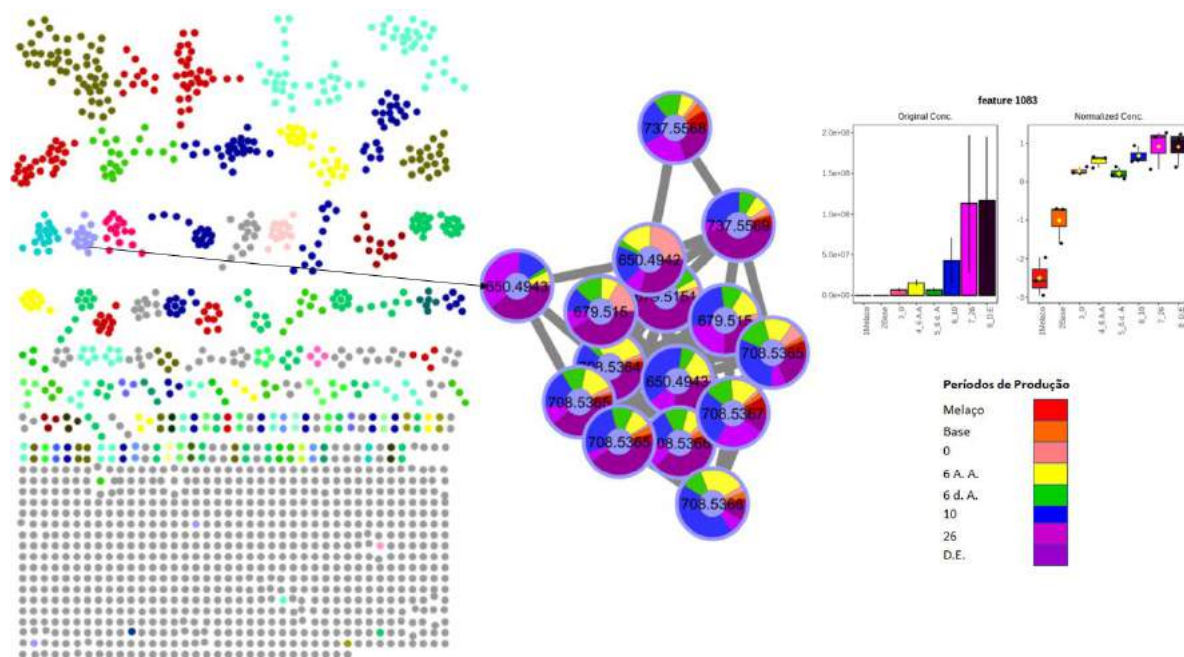


Figura B7. Feature 1083 (m/z 650.4943) presente na tabela de VIP scores do PLS-DA, com proposta de anotação nível 3 para a classe dos compostos orgânicos nitrogenados.

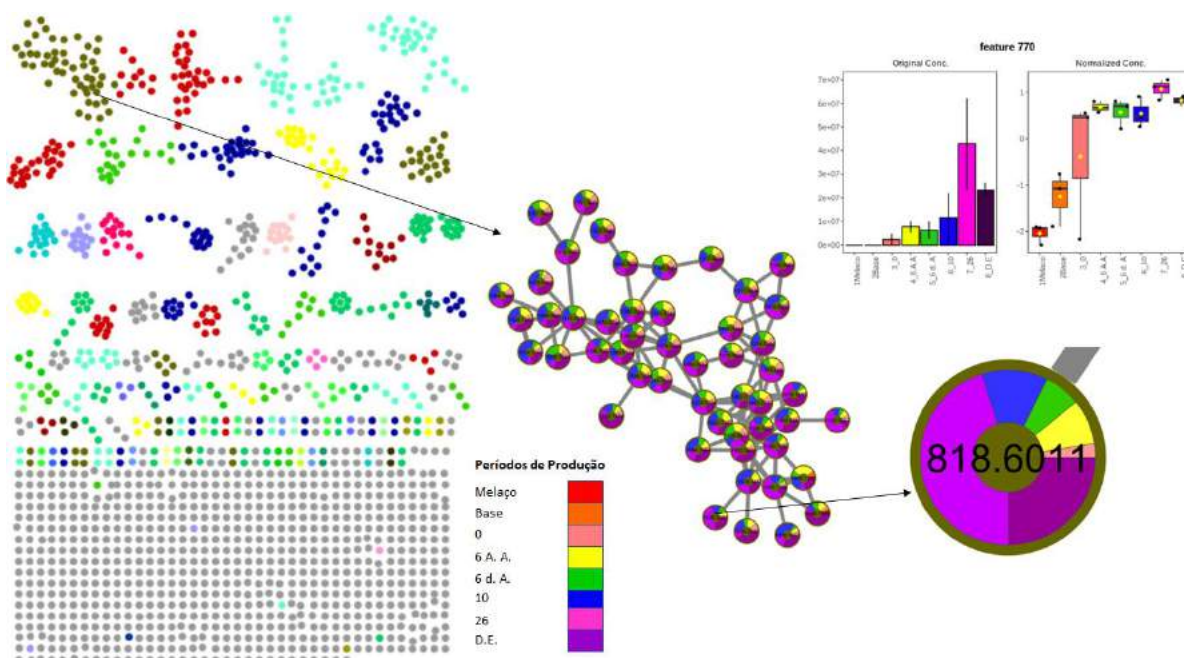


Figura B8. Feature 770 (m/z 818.6011) presente na tabela de VIP scores do PLS-DA, com proposta de anotação nível 3 para a classe dos terpenóides.

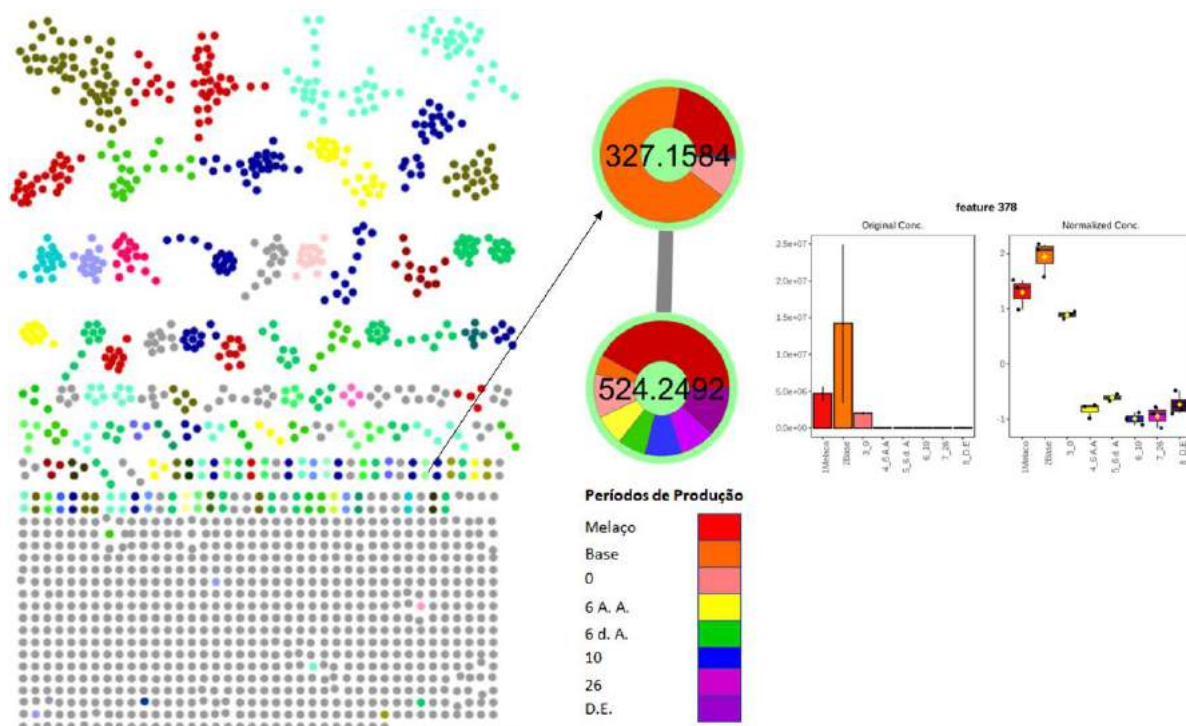


Figura B9. Feature 378 (m/z 327.1584) presente na tabela de VIP scores do PLS-DA, com proposta de anotação nível 3 para a classe dos benzofuranos.

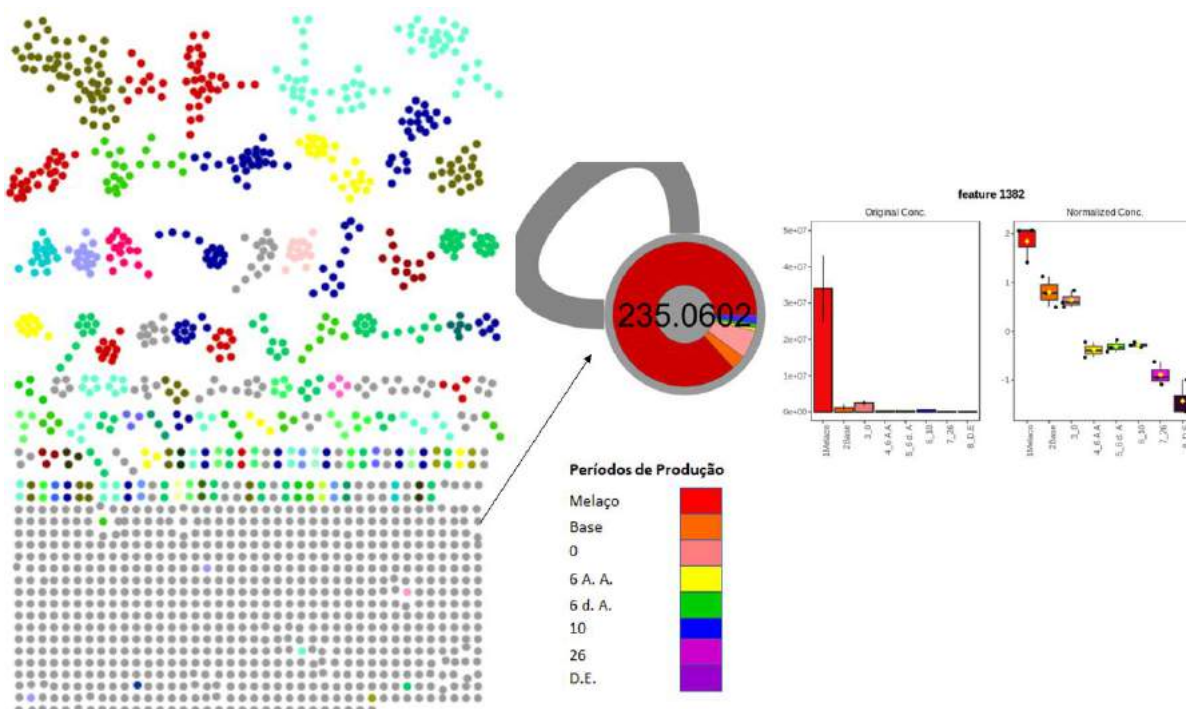


Figura B10. Feature 1382 (m/z 235.0602) presente na tabela de VIP scores do PLS-DA, com proposta de anotação nível 4.

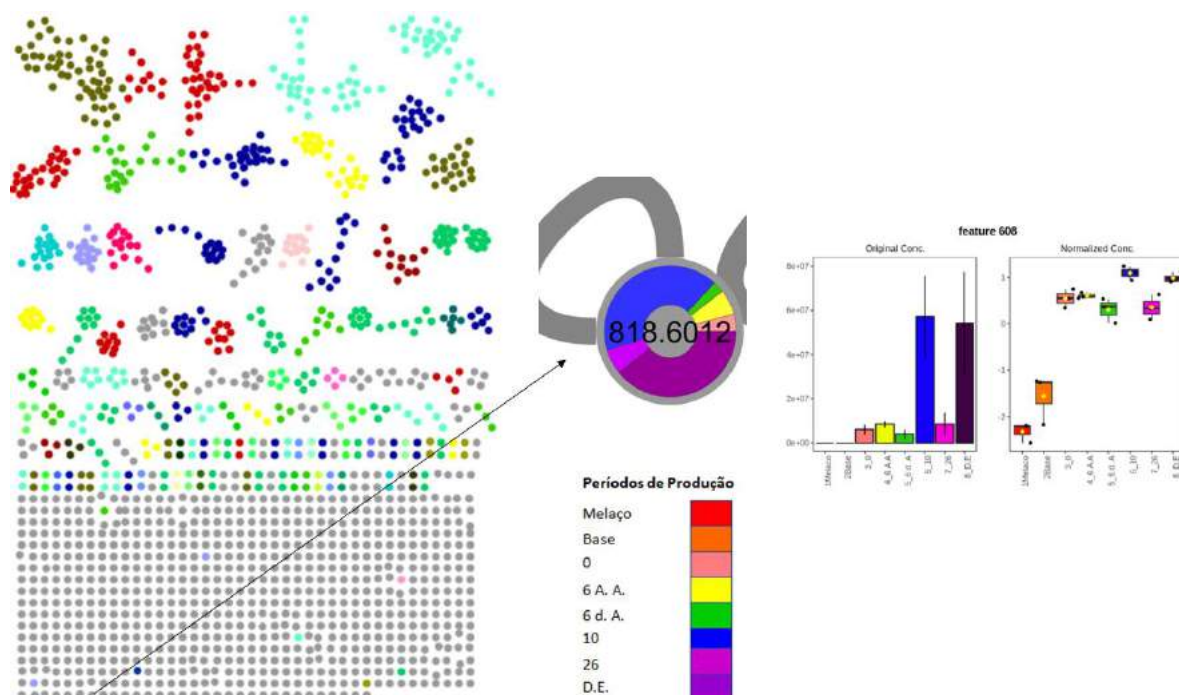


Figura B11. Feature 608 (m/z 818.6012) presente na tabela de VIP scores do PLS-DA, com proposta de anotação nível 4.

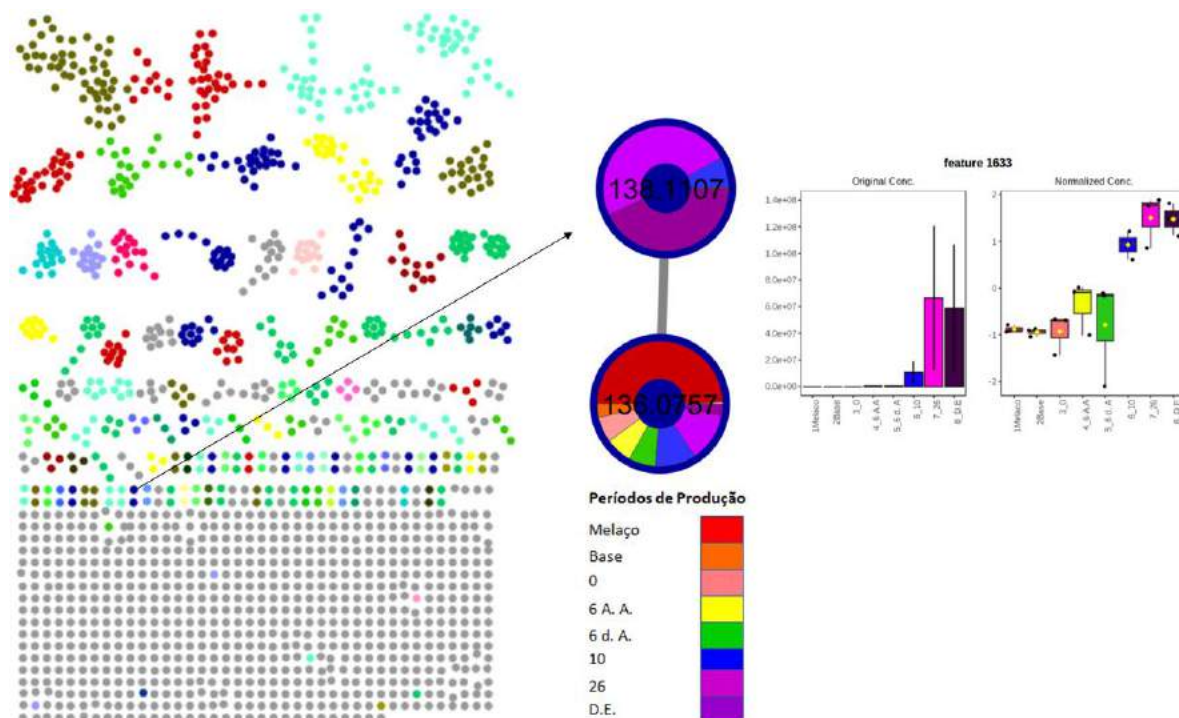


Figura B12. Feature 1633 (m/z 138.1107) presente na tabela de VIP scores do PLS-DA, com proposta de anotação nível 3 para a classe dos compostos orgânicos oxigenados.

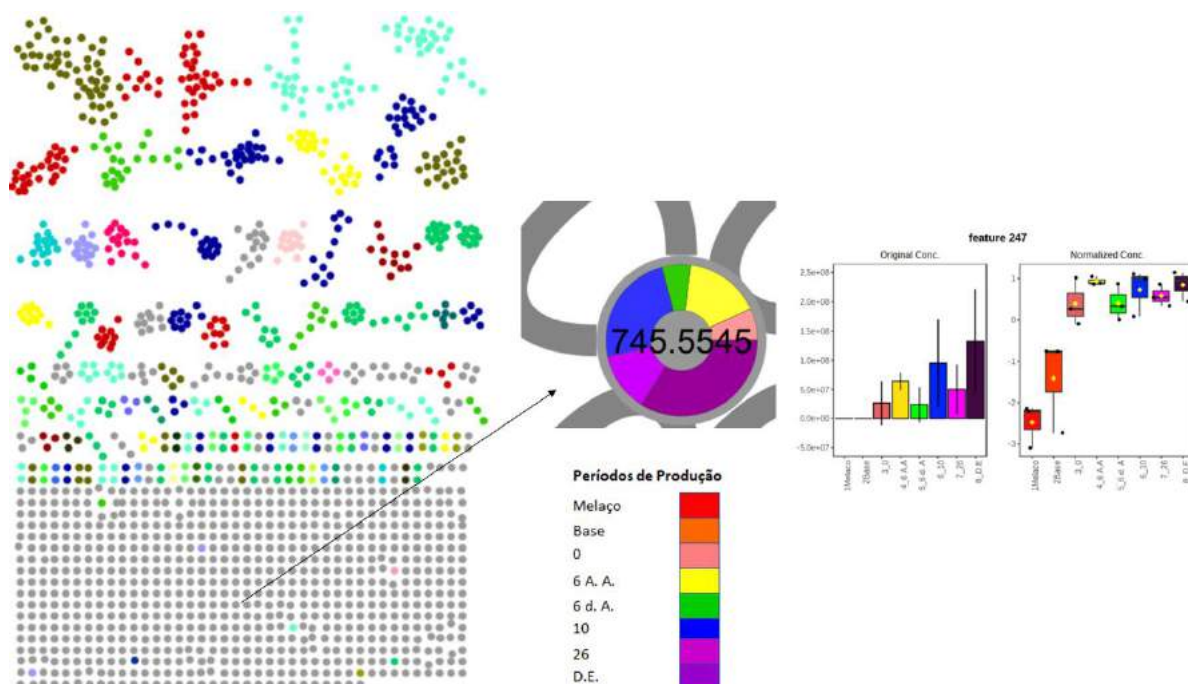


Figura B13. Feature 247 (m/z 745.5545) presente na tabela de VIP scores do PLS-DA, com proposta de anotação nível 4.

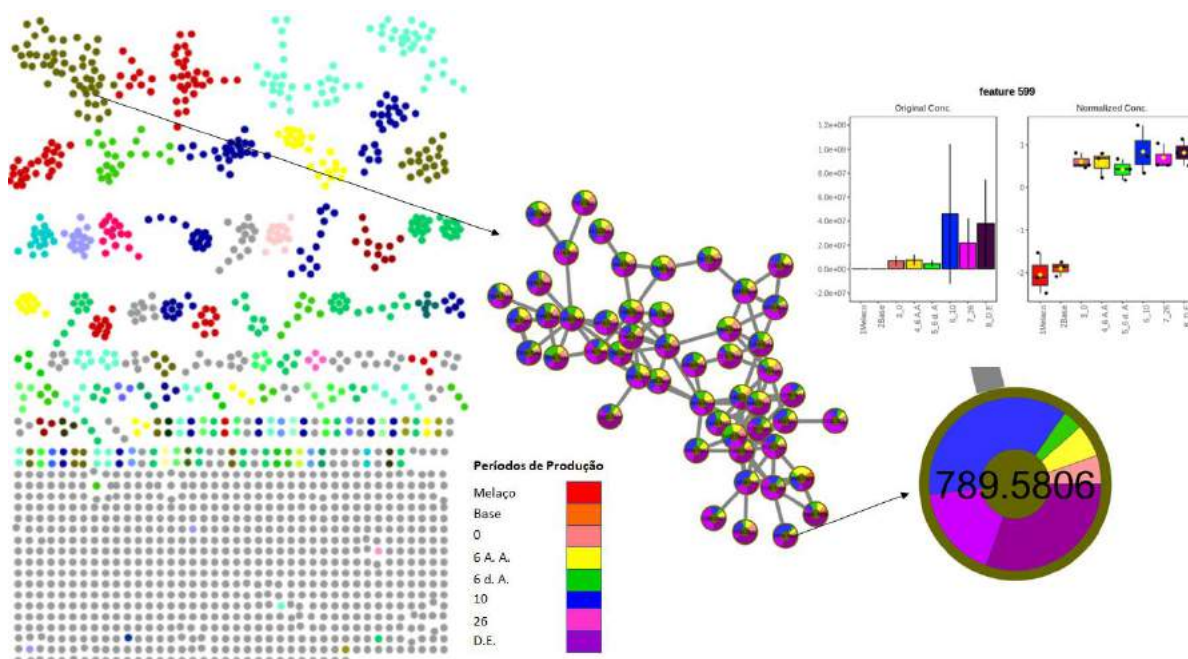


Figura B14. Feature 599 (m/z 789.5806) presente na tabela de VIP scores do PLS-DA, com proposta de anotação nível 3 para a classe dos terpenóides.