

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**ESTUDO DE MICRORGANISMOS E SEUS METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS NO CONTROLE DE *PHAKOPSORA PACHYRHIZI*,
CAUSADOR DE FERRUGEM ASIÁTICA NA SOJA**

Orientadora: Prof. Dra. Simone Possedente de Lira

Piracicaba-SP
2023

RAFAELA CRISTINE ALVES MARÇAL

**Estudo de Microrganismos e seus Metabólitos Secundários no controle de
Phakopsora pachyrhizi, causador de ferrugem na soja.**

Trabalho apresentado no curso de graduação de Ciências Biológicas na
Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Possedente de Lira
Departamento de Ciências Exatas- área química

**Piracicaba-SP
Junho/2023**

1. RESUMO

A soja está dentre os cinco grãos mais cultivados e consumidos no mundo. O complexo agroindustrial da soja é um dos mais importantes para a economia Brasileira, e os sojicultores estão entre os que mais utilizam defensivos agrícolas no Brasil.

Por outro lado, as projeções de mercado de bio defensivos indicam grande crescimento atual e para os próximos anos. Portanto existe uma grande demanda por insumos biológicos, como microrganismos e seus metabolitos secundários que apresentam ação fungitóxica à fitopatogenos. Dessa forma, pretendemos a partir de uma prospecção (já iniciada) com 50 microrganismos isolados de diversos ambientes, selecionar dois microrganismos promissores no controle do fitopatogeno *Phakopsora pachyrhizi* (causador de ferrugem, este ensaio será em folha destacada) de soja, e investigar seu potencial para controle biológico, bem como seus metabolitos secundários. Para tanto, os 10 microrganismos serão avaliados em ensaios in vitro para este fitopatógeno e serão selecionados os 2 microrganismos mais promissores que serão identificados por técnicas moleculares e também terão seus metabolitos secundários caracterizados por UPLC-qTOF em um estudo de metabolômica. Um microrganismo mais promissor será cultivado em maior escala e terão seus metabolitos secundários isolados por técnicas cromatográficas e identificados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas. Esperamos contribuir com novas opções de insumos biológicos para o controle biológico no manejo sustentável da soja, aumentando a segurança alimentar de uma das principais culturas do Brasil e do mundo.

1.1 OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo principal investigar os metabolitos secundários produzidos por microrganismos, quanto a ação fungicida ao fitopatogeno *Phakopsora pachyrhizi* causador de ferrugem na soja, através da seleção, cultivo, extração e fracionamento de 10 isolados de microrganismos, avaliando em ensaios in vitro podendo-se selecionar ao menos uma linhagem promissora, que será caracterizada por Molecular Networking.

2. Justificativa

A descoberta de novos produtos naturais tem conferido grandes benefícios à humanidade. As plantas, os micro-organismos e alguns grupos restritos de animais são os principais produtores de biomoléculas ativas com aplicabilidade farmacológica, agrícola e industrial.

Por muito tempo a busca por compostos bioativos concentrou-se em espécies vegetais, porém, o estudo de micro-organismos mostrou-se importante para viabilizar a descoberta de substâncias com importância biotecnológica (SESSITSCH et al., 2004).

A investigação dos metabólitos secundários produzidos pelos micro-organismos contribui para a descoberta de novas substâncias (LIU et al., 2005). Estes metabólitos, não estão diretamente envolvidos nas funções básicas necessárias para a vida dos organismos produtores, mas conferem algumas propriedades importantes para a sobrevivência e perpetuação dessas espécies no biossistema (SANTOS, 2001). Os compostos microbianos podem inibir o crescimento e desenvolvimento de outros organismos presentes no mesmo habitat, conferindo assim, vantagens adaptativas/competitivas ao desenvolvimento do micro-organismo produtor (KHALDI et al., 2010).

Estes compostos ativos, conhecidos por metabólitos secundários, são sintetizados na fase estacionária do crescimento microbiano, geralmente sendo bioativos e de baixa massa molecular (LOPES, 2011). Esses metabólitos parecem ser sintetizados quando são acumuladas grandes quantidades de precursores de metabólicos primários, como aminoácidos, acetato e piruvato. Estudos realizados sobre a síntese de metabólitos secundários identificaram algumas características comuns. Entre elas, destacamos: a incapacidade de todas as linhagens de uma mesma espécie de produzirem determinado metabólito; a não essencialidade da

produção desses compostos para o crescimento e reprodução do micro-organismo e codificação da síntese dos compostos por conjuntos de genes não essenciais. Além disso, as condições de cultivo como, por exemplo, a composição do meio pode controlar a produção destes metabólitos (JAY, 2005; KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; MARTÍN et al., 2005; YU; KELLER, 2005; NIGAM, 2009).

Os metabólitos podem ser agrupados em várias classes químicas: alcaloides, esteroides, terpenos, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, lignanas, ácidos fenólicos entre outros (SCHULZ; BOYLE, 2005; CHAPLA et al., 2012).

Várias bactérias, inclusive actinobactérias (GROTH et al., 1999) podem exibir efeito antagônico sobre os fungos, devido a capacidade destas, em produzir sideróforos, enzimas hidrolíticas ou antibióticos. A síntese destes compostos seria um mecanismo de defesa que garantiria a sobrevivência destas, em ambientes competitivos, como no solo, por exemplo.

Para as culturas agrícolas, estes organismos podem contribuir para a viabilidade do vegetal, pois estes podem atuar como agentes controladores de fitopatógenos, tais como fungos e insetos, dentre outros (Azevedo et al., 2000).

Alguns defensivos agrícolas comercializados atualmente foram sintetizados a partir de compostos produzidos pelos actinobactérias. Por exemplo, o Mycostop® que é um biofungicida confeccionado com isolados de *Streptomyces griseoviridis* K61. Este produto comercial é recomendado no controle de algumas doenças da podridão de raízes causadas por *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Phytophthora* sp. (MINUTO et al., 2006).

Atualmente diversos métodos de controle para doenças causadas por fungos à culturas, das quais incluem o controle químico, poda fitossanitária e a utilização de clones resistentes. Ainda assim, as formas de controle são onerosas, ineficazes e apresentam riscos ao ecossistema e a saúde humana; e, portanto existe uma

demanda por pesquisas que busquem alternativas de controle aos fungos fitopatogênicos, que junto com as demais medidas promovam um manejo integrado mais eficiente.

3. METODOLOGIA

3.1 Linhagens de Microrganismos

As linhagens serão da própria coleção de trabalho existentes no nosso grupo de pesquisa, no Depto de Ciências Exatas- Laboratório de Microbiologia e Produtos Naturais ESALQ-USP.

3.2 Cultivo dos microrganismos selecionados e extração

Para obtenção do meio metabólico, o isolado será cultivado em meio líquido utilizando-se 4 plugs com 7 mm de diâmetro das bordas recém-repicadas da linhagem e transferidos para Erlenmeyers de 250 mL, contendo 150 mL de meio BD (batata dextrose), durante 5 a 30 dias (dependendo do isolado) em agitação constante de 150 rpm, a 28°C (Incubator Shaker Series-Innova 40-New Brunswick Scientific) ou em modo estático. Poderão ser utilizados outros parâmetros para o cultivo visando a obtenção de maior quantidade e variedade de metabólitos secundários.

Após o crescimento, o meio metabólico será filtrado para retirada do micro-organismo e será submetido a partição líquido-líquido, para obtenção de duas frações: a fração aquosa e a fração acetato de etila. A fração aquosa será liofilizada para a retirada de toda a água presente na amostra e a fração orgânica será concentrada em um evaporador rotativo (MA 120–Marconi) para a retirada de todo o solvente presente na amostra. Todas as frações serão codificadas, pesadas e

armazenadas sob refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$). Outras metodologias poderão ser desenvolvidas para a extração dos metabólitos secundários.

3.3 Separação e caracterização do(s) metabólito(s) secundário(s) (ETAPA A SER REALIZADA)

As frações serão monitoradas quimicamente segundo similaridade química observadas em cromatofolhas de sílica-gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F254 20 x 20 cm (Aldrich). As cromatofolhas serão reveladas por inspeção sob luz ultravioleta (UV) com lâmpada de emissão nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm, além de serem usados reveladores específicos (Dragendorff, ácido fosfomolibdico, ninidrina e outros).

A separação de compostos dependerá das características químicas da fração. Serão utilizadas diversas técnicas cromatográficas, por exemplo, cromatografias em colunas pré-empacotadas do tipo Sep-Pak de diferentes dimensões (2g, 5g ou 10g) e com diferentes fases estacionárias (sílica-gel ou sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano, fenila ou cianopropila). A fase móvel deverá ser otimizada caso a caso.

Para separações por exclusão de tamanho (ou peso molecular), será utilizado a cromatografia de permeação em gel, com fase estacionária de Sephadex LH-20 fase móvel isocrática com MeOH grau P.A.

Quando a fração se apresentar semi-pura (poucos compostos), será submetida a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (HPLC-UV). As condições serão otimizadas segundo a natureza dos compostos.

Serão estudadas e avaliadas metodologias de isolamento visando aperfeiçoar o processo de separação no mínimo de etapas cromatográficas para a obtenção de compostos puros, com o máximo de rendimento.

Para caracterização química dos compostos, as amostras serão analisadas no equipamento Acquity UPLC H Class - Xevo G2-XS Qtof (Waters), operando em modo eletrospray com faixa de detecção entre 100 a 1500 Da e energia de ionização 1,2 Kv. Os valores de m/z serão obtidos no modo centroide, em modo positivo. A fase estacionária utilizada será uma coluna Acquity UPLC BEH C₁₈ (1,7 μ m, 2,1 x 100 mm) e a fase móvel será em gradiente de (A) água ultrapura (acidificada 0,1% de ácido fórmico) em (B) acetonitrila grau HPLC, com vazão de 0,5 mL min⁻¹. Os dados brutos serão convertidos do formato 'raw' para 'mzXML' com o software MSConvert e analisados no banco de dados do GNPS e será gerada uma rede para visualização no software Cytoscape.

3.4 Ensaios de cultivo pareado e folha destacada

Para seleção dos microrganismos com potencial de biocontrole serão realizados ensaios de cultivo pareado em placas de Petri. O delineamento experimental será inteiramente casualizado com três repetições por tratamento em condições controladas (câmaras B.O.D. a 25°C com fotoperíodo de 12h). As unidades amostrais consistirão de placas de Petri contendo meio BDA. Em cada placa serão colocados dois discos de micélio, de 5 mm de diâmetro, um da cultura do fitopatógeno e outro em lado oposto do microrganismo que será avaliado. Como controles serão feitas placas apenas com o fitopatógeno e placas apenas com o microrganismo em teste. As placas serão observadas quase que diariamente até que o micélio do fitopatógeno nas placas controle tenha se desenvolvido por toda placa. Nesse momento serão produzidas fotos das unidades amostrais (placas de Petri) e a área de inibição será mensurada com régua para posterior determinação da % de inibição de cada microrganismo/fitopatógeno.

Para os ensaios com o fungo *P. packyrhizi* serão utilizados trifólios de plantas de soja aspergidos com uma suspensão dos microrganismos agentes de biocontrole e, três a cinco dias após, a inoculação desses trifólios com uma suspensão de uredósporos de *P. packyrhizi*. Os trifólios serão mantidos em placas de Petri com ágar-água (2%) durante todo ensaio. Serão utilizadas suspensões concentradas a 10⁵ esporos/mL dos agentes de biocontrole e de *P. packyrhizi*. Aos sete dias após a inoculação serão avaliadas as severidades dos sintomas de ferrugem da soja nos trifólios. Como controles positivo e negativo serão utilizados trifólios apenas com o microrganismo agente de biocontrole e *P. packyrhizi*, respectivamente. Como repetições serão utilizados cinco trifólios para cada combinação microrganismo/*P. packyrhizi*.

Os dados dos bioensaios serão analisados com o software "R", versão 3.3.1. Serão utilizados modelos lineares generalizados com distribuição normal ou quasibinomial e quasipoisson juntamente com um gráfico de probabilidade semi-normal com envelope de simulação para verificar o ajuste dos modelos. No caso de diferenças significativas entre os tratamentos, será realizado um teste de comparação múltipla de médias para identificar tais diferenças. As placas do ensaio antagonista de cultivo pareado e do teste de difusão em disco também serão fotodocumentadas para ilustrar a porcentagem de inibição do crescimento dos fitopatógenos alvo de biocontrole.

3.5 Ensaio biológico *in vitro*

No bioensaio serão avaliados os extratos brutos e as frações pelo método de difusão em disco de papel e pelo método de infusão.

Pelo método de difusão em disco de papel, o extrato (ou fração a ser avaliado, em concentração otimizada) será aplicado em disco de papel estéril (6 mm de

diâmetro) e do lado oposto na mesma placa de Petri um plug do fungo fitopatogeno. As placas inoculadas serão mantidas em B.O.D. a 28°C (parâmetro aproximado, mas que será otimizada inicialmente) até que o controle dos tratamentos colonize toda a placa. Após este período as placas serão avaliadas em comparação aos seus controles, para observação do aparecimento de halos ou inibição de crescimento. O ensaio será realizado em triplicata.

As placas inoculadas serão mantidas em BOD a 28°C, de 5 a 8 dias, tempo em que o controle, somente com o fitopatógeno, deverá colonizar totalmente a placa de Petri. Após este período, a porcentagem de inibição será avaliada.

Para analisar o percentual de inibição do crescimento dos fitopatógenos em ensaio antagônico e bioensaios *in vitro*, serão realizadas medidas do crescimento micelial do fitopatógeno em dois eixos ortogonais, comparando-os com as medidas do controle (apenas com fitopatógeno). A porcentagem de inibição será calculada segundo a fórmula de EDGINGTON et al., (1971).

$$PIC = \frac{(\text{Diâmetro da testemunha} - \text{Diâmetro do tratamento}) \times 100}{\text{Diâmetro da testemunha}}$$

Onde:

PIC = Porcentagem de inibição do crescimento

Diâmetro da test = *Diâmetro da testemunha*

Diâmetro do trat = *Diâmetro do tratamento*

No método de infusão em ágar, as placas de Petri serão preparadas com meios específicos para fungos alvos. Ao meio de cultivo após ser autoclavado, serão incorporadas as amostras (extratos ou frações a serem avaliadas). A avaliação será realizada após o controle atingir todo o crescimento da placa de Petri. Então será realizada uma medida em dois eixos ortogonais. Os experimentos serão realizados em triplicata.

3.6 Coleta de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*

A coleta de esporos do fungo *Phakopsora pachyrhizi* será realizada utilizando-se plantas cultivadas apenas para a finalidade do cultivo do fungo. A cada 15 dias, ocorrerá a semeadura de 5 plantas, inoculadas com esporos pré coletados.

A primeira coleta se fará em plantas não pertencentes ao laboratório, obtendo-se as condições de automanutenção a partir da segunda coleta, ou seja, os esporos coletados a partir da primeira inoculação servirão para a contaminação das demais plantas semeadas.

4 Resultados Esperados

Espera-se com este estudo contribuir com informações sobre a comunidade microbiana e a aplicação dos seus metabólitos secundários ativos.

5 Cronograma

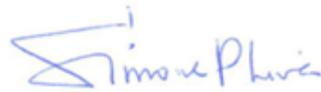
Atividade/ mês de execução	1° mês	2° mês	3° mês	4° mês	5° mês	6° mês
Levantamento bibliográfico						
Repique dos microrganismos para cultivo						
Separação e caracterização do(s) metabólito(s) secundários						
Ensaio de cultivo pareado e folha destacada						
Ensaio biológico <i>in vitro</i>						
Coleta de esporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>						

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, J.L.; JUNIOR, W.M.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Environmental Biotechnology**, Gronity, v.3, n.1, p.40-64, 2000.
- CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 215-221, 2012.
- GROTH, I.; VETTERMANN, R.; SCHUETZE, B.; SCHUMANN, P.; SÁIZ-JIMÉNEZ, C. Actinomycetes in karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). **Journal of microbiological methods**, v. 36, n. 1-2, p. 115-122, 1999.
- JAY, J. M. Parâmetros Intrínsecos e extrínsecos dos alimentos que afetam o crescimento microbiano. **Jay JM. Microbiologia de alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed**, p. 51-72, 2005.
- KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 937, 2005
- KHALDI, N.; SEIFUDDIN, F. T.; TURNER, G.; HAFT, D.; NIERMAN, W. C.; WOLFE, K. H.; FEDOROVA, N. D. SMURF: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 9, p. 736-741, 2010.
- LIU, H.; GROTH, S.; LOGAN, B. E. Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 11, p. 4317-4320, 2005.
- LOPES, F. C. Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos. Dissertação de Mestrado: Biologia Celular e Molecular, UFRGS, 2011.
- MARTÍN, J. F.; CASQUEIRO, J.; LIRAS, P. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 3, p. 282-293, 2005.
- MINUTO, A.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. **Crop Protection**, v. 25, n. 5, p. 468-475, 2006.
- NIGAM, P.S. Production of bioactive secondary metabolites. In: NIGAM, P.S.; PANDEY, A. (Ed.). **Biotechnology for agro-industrial residues utilization**. Netherlands: Springer, 2009. p.129-145.
- SANTOS, S. M. **Caracterização de microorganismos aquáticos por processamento digital de imagens e redes neurais artificiais**. Tese de Doutorado: Engenharia Mecânica, UFRGS, 2001.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian journal of microbiology**, v. 50, n. 4, p. 239-249, 2004.

YU, J. H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 43, p. 437-458, 2005.



X

Simone Possedente de Lira
Professora Doutora



X

Rafaela Cristine Alves Marçal
Graduanda em Ciências Biológicas



DETALHAMENTO DAS ATIVIDADES

1. Estudo Microrganismos e seus Metabólitos Secundários no controle de *Phakopsora pachyrhizi*, causador de ferrugem na soja. Vigência 01/09/2023 - 31/08/2024. Agência Financiadora: USP Programa Unificado de Bolsas (PUB).

2. Justificativas:

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de soja e, dentre os principais fitopatógenos, que mais acarretam perdas nas produções, está a ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. A doença provoca desfolha prematura impedindo a formação de grãos, exigindo, assim, tratamento químico durante todo o seu ciclo.

Os microrganismos são produtores de biomoléculas ativas, aplicáveis no setor agrícola, industrial e farmacológico. Seu estudo, portanto, é crucial quando falamos em avanços biotecnológicos. Esses metabólitos secundários, geralmente são sintetizados durante a seu crescimento. Podem ser alcaloides, esteroides, terpenos, entre outros e podem causar a inibição do crescimento de outros organismos no mesmo ambiente, inclusive fitopatogênicos.

Devido à natureza do trabalho de química de produtos naturais de micro-organismos que envolve a utilização de meios de cultivo, inóculos de micro-organismos e solventes orgânicos para a extração e fracionamento dos extratos, fazemos a submissão do projeto à Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa — ESALQ/USP.

3. Objetivos:

Geral: investigar os metabólitos secundários produzidos por microrganismos, quanto a ação fungicida ao fitopatógeno *Phakopsora pachyrhizi* causador de ferrugem na soja.

Específicos:

- Seleção de 10 isolados de microrganismos;
- Cultivo dos microrganismos;
- Extração e Fracionamento;
- Avaliação em ensaios in vitro;
- Seleção de 1 linhagem promissora;
- Caracterização por Molecular Networking;

4. Metodologia:

4.1. Linhagens de Microrganismos

As linhagens serão da própria coleção de trabalho existentes no nosso grupo de pesquisa, no Depto de Ciências Exatas- Laboratório de Microbiologia e Produtos Naturais ESALQ-USP.

4.2. Cultivo dos microrganismos selecionados e extração

Para obtenção do meio metabólico, o isolado será cultivado em meio líquido utilizando-se 4 plugs com 7 mm de diâmetro das bordas recém-repicadas da linhagem e transferidos para



COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP

Erlenmeyers de 250 mL, contendo 150 mL de meio BD (batata dextrose), durante 5 a 30 dias (dependendo do isolado) em agitação constante de 150 rpm, a 28°C (Incubator Shaker Series-Innova 40-New Brunswick Scientific) ou em modo estático. Poderão ser utilizados outros parâmetros para o cultivo visando a obtenção de maior quantidade e variedade de metabólitos secundários.

Após o crescimento, o meio metabólico será filtrado para retirada do micro-organismo e será submetido a partição líquido-líquido, para obtenção de duas frações: a fração aquosa e a fração acetato de etila. A fração aquosa será liofilizada para a retirada de toda a água presente na amostra e a fração orgânica será concentrada em um evaporador rotativo (MA 120–Marconi) para a retirada de todo o solvente presente na amostra. Todas as frações serão codificadas, pesadas e armazenadas sob refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$). Outras metodologias poderão ser desenvolvidas para a extração dos metabólitos secundários.

4.3. Separação e caracterização do(s) metabólito(s) secundário(s)

As frações serão monitoradas quimicamente segundo similaridade química observadas em cromatofolhas de sílica-gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F254 20 x 20 cm (Aldrich). As cromatofolhas serão reveladas por inspeção sob luz ultravioleta (UV) com lâmpada de emissão nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm, além de serem usados reveladores específicos (Dragendorff, ácido fosfomolibdico, ninidrina e outros).

A separação de compostos dependerá das características químicas da fração. Serão utilizadas diversas técnicas cromatográficas, por exemplo, cromatografias em colunas pré-empacotadas do tipo Sep-Pak de diferentes dimensões (2g, 5g ou 10g) e com diferentes fases estacionárias (sílica-gel ou sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano, fenila ou cianopropila). A fase móvel deverá ser otimizada caso a caso.

Para separações por exclusão de tamanho (ou peso molecular), será utilizado a cromatografia de permeação em gel, com fase estacionária de Sephadex LH-20 fase móvel isocrática com MeOH grau P.A.

Quando a fração se apresentar semi-pura (poucos compostos), será submetida a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (HPLC-UV). As condições serão otimizadas segundo a natureza dos compostos.

Serão estudadas e avaliadas metodologias de isolamento visando aperfeiçoar o processo de separação no mínimo de etapas cromatográficas para a obtenção de compostos puros, com o máximo de rendimento.

Para caracterização química dos compostos, as amostras serão analisadas no equipamento Acquity UPLC H Class - Xevo G2-XS Qtof (Waters), operando em modo eletrospray com faixa de detecção entre 100 a 1500 Da e energia de ionização 1,2 Kv. Os valores de m/z serão obtidos no modo centroide, em modo positivo. A fase estacionária utilizada será uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μm , 2,1 x 100 mm) e a fase móvel será em gradiente de (A) água ultrapura (acidificada 0,1% de ácido fórmico) em (B) acetonitrila grau HPLC, com vazão de 0,5 mL min⁻¹. Os dados brutos serão convertidos do formato 'raw' para 'mzXML' com o software MSConvert e analisados no banco de dados do GNPS e será gerada uma rede para visualização no software Cytoscape.

4.4. Ensaio de cultivo pareado e folha destacada

Para seleção dos microrganismos com potencial de biocontrole serão realizados ensaios de cultivo pareado em placas de Petri. O delineamento experimental será inteiramente casualizado com três repetições por tratamento em condições controladas (câmaras B.O.D.



COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP

a 25°C com fotoperíodo de 12h). As unidades amostrais consistirão de placas de Petri contendo meio BDA. Em cada placa serão colocados dois discos de micélio, de 5 mm de diâmetro, um da cultura do fitopatógeno e outro em lado oposto do microrganismo que será avaliado. Como controles serão feitas placas apenas com o fitopatógeno e placas apenas com o microrganismo em teste. As placas serão observadas quase que diariamente até que o micélio do fitopatógeno nas placas controle tenha se desenvolvido por toda placa. Nesse momento serão produzidas fotos das unidades amostrais (placas de Petri) e a área de inibição será mensurada com régua para posterior determinação da % de inibição de cada microrganismo/fitopatógeno.

Para os ensaios com o fungo *P. packyrhizi* serão utilizados trifólios de plantas de soja aspergidos com uma suspensão dos microrganismos agentes de biocontrole e, três a cinco dias após, a inoculação desses trifólios com uma suspensão de uredósporos de *P. packyrhizi*. Os trifólios serão mantidos em placas de Petri com ágar-água (2%) durante todo ensaio. Serão utilizadas suspensões concentradas a 10⁵ esporos/mL dos agentes de biocontrole e de *P. packyrhizi*. Aos sete dias após a inoculação serão avaliadas as severidades dos sintomas de ferrugem da soja nos trifólios. Como controles positivo e negativo serão utilizados trifólios apenas com o microrganismo agente de biocontrole e *P. packyrhizi*, respectivamente. Como repetições serão utilizados cinco trifólios para cada combinação microrganismo/*P. packyrhizi*.

Os dados dos bioensaios serão analisados com o software "R", versão 3.3.1. Serão utilizados modelos lineares generalizados com distribuição normal ou quasibinomial e quasipoisson juntamente com um gráfico de probabilidade semi-normal com envelope de simulação para verificar o ajuste dos modelos. No caso de diferenças significativas entre os tratamentos, será realizado um teste de comparação múltipla de médias para identificar tais diferenças. As placas do ensaio antagonista de cultivo pareado e do teste de difusão em disco também serão fotodocumentadas para ilustrar a porcentagem de inibição do crescimento dos fitopatógenos alvo de biocontrole.

4.5. Ensaio biológico in vitro

No bioensaio serão avaliados os extratos brutos e as frações pelo método de difusão em disco de papel e pelo método de infusão.

Pelo método de difusão em disco de papel, o extrato (ou fração a ser avaliado, em concentração otimizada) será aplicado em disco de papel estéril (6 mm de diâmetro) e do lado oposto na mesma placa de Petri um plug do fungo fitopatogênico. As placas inoculadas serão mantidas em B.O.D. a 28°C (parâmetro aproximado, mas que será otimizada inicialmente) até que o controle dos tratamentos colonize toda a placa. Após este período as placas serão avaliadas em comparação aos seus controles, para observação do aparecimento de halos ou inibição de crescimento. O ensaio será realizado em triplicata.

As placas inoculadas serão mantidas em BOD a 28°C, de 5 a 8 dias, tempo em que o controle, somente com o fitopatógeno, deverá colonizar totalmente a placa de Petri. Após este período, a porcentagem de inibição será avaliada.

Para analisar o percentual de inibição do crescimento dos fitopatógenos em ensaio antagônico e bioensaios in vitro, serão realizadas medidas do crescimento micelial do fitopatógeno em dois eixos ortogonais, comparando-os com as medidas do controle (apenas com fitopatógeno). A porcentagem de inibição será calculada segundo a fórmula de EDGINGTON et al., (1971).

$$(\text{Diâmetro da testemunha} - \text{Diâmetro do tratamento}) \times 100$$



PIC =

Diâmetro da testemunha

Onde:

PIC = Porcentagem de inibição do crescimento

Diâmetro da test = Diâmetro da testemunha

Diâmetro do trat = Diâmetro do tratamento

No método de infusão em ágar, as placas de Petri serão preparadas com meios específicos para fungos alvos. Ao meio de cultivo após ser autoclavado, serão incorporadas as amostras (extratos ou frações a serem avaliadas). A avaliação será realizada após o controle atingir todo o crescimento da placa de Petri. Então será realizada uma medida em dois eixos ortogonais. Os experimentos serão realizados em triplicata.

5. Bibliografia pertinente à metodologia:

ELIAS, L. M.; FORTKAMP, D.; SARTORI, S. B.; FERREIRA, M. C.; GOMES, L. H.; AZEVEDO, J. .L.; MONTOYA, Q. V.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, A. G.; LIRA, S. P. The potential of compounds isolated from *Xylaria* spp. as antifungal agents against anthracnose. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 840–847, 2018. GRIGOLETTO, D. F.; CORREIA-LIMA, A. M.;

ABRAHAM, W. R.; RODRIGUES, A.; ASSIS, M. A.; FERREIRA, A. G.; MASSAROLI, M.; LIRA, S. P. Secondary metabolites produced by endophytic fungi: Novel antifungal activity of fumiquinone B. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 41, n. 1, p. e48785, 2019.

BRITES-NETO, J.; MAIMONE, N. M.; DE STEFANO PIEDADE, S. M.; ANDRINO, F. G.; MAIA DE ANDRADE, P. A.; BARONI, F. A.; GOMES, L. H.; LIRA, S. P. Scorpionicidal activity of secondary metabolites from *Paecilomyces* sp. CMAA1686 against *Tityus serrulatus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 179, n. January, 2021.

VICENTE DOS REIS, G.; ABRAHAM, W. R.; GRIGOLETTO, D. F.; CAMPOS, J. B.; MARCON, J.; SILVA, J. A.; QUECINE, M. C.; AZEVEDO, J. L.; FERREIRA, A. G.; LIRA, S. P. Gloeosporiocide, a new antifungal cyclic peptide from *Streptomyces morookaense* AM25 isolated from the Amazon bulk soil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 14, p. 1–10, 2019.

6. Descrição dos possíveis resíduos gerados e procedimentos para a gestão dos mesmos conforme normas vigentes:



COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP

Exemplo:

Item	Descrição do resíduo	Tipo de tratamento	Quantidade estimada (Kg/ano) produzida
1	Metanol 100%	Estocado para reaproveitamento após tratamento ou incineração	10
2	Acetato de etila	Estocado para reaproveitamento após tratamento ou incineração	10
3	Metanol-Acetona 1:1	Estocado para reaproveitamento após tratamento ou incineração	10
4	Metanol-Água 1:1	Estocado para reaproveitamento após tratamento ou incineração	10
5	Descarte de material biológico de cultivos de fungos e bactérias	Autoclavado e estocado armazenado para posterior incineração	20
6	Material de microbiologia (placas, alças, luvas, ponteiros, máscaras)	Autoclavado e estocado armazenado para posterior incineração	20
Total			80

7. Lista dos usuários do laboratório onde serão desenvolvidos os projetos de pesquisa

Usuários		
1	Nome: Rafaela Cristine Alves Marçal	
	Função*: IC	Nº USP: 11878212
	Início das atividades no Laboratório: 01 / 09 / 23 fim: 31 / 08 / 24	
2	Nome: Juan Lopes Teixeira	
	Função*: Mestrado	Nº USP: 14379385
	Início das atividades no Laboratório: 01 / 09 / 23 fim: 31 / 08 / 24	
3	Nome: Jairo Ivan Quintana Bulla	
	Função*: Pós-Doc	Nº USP: 10218933
	Início das atividades no Lab.: 01 / 09 / 23 fim: 31 / 08 / 24	
4	Nome: Simone Possedente de Lira	
	Função*: Docente	Nº USP: 1882809
	Início das atividades no Laboratório: 01 / 09 / 23 fim: 31 / 08 / 24	

*Função: Docente, técnico, IC, Mestrado, Doutorado, Pós-Doc, visitante.



COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP

Simone Possedente de Lira

X

Simone Possedente de Lira
Professora Doutora

Rafaela Cristine Alves Marçal

X

Rafaela Cristine Alves Marçal
Graduanda em Ciências Biológicas

De: **CEAP** <ceap_otrs@usp.br>
Date: seg., 23 de out. de 2023 às 17:31
Subject: [Ticket#2023102399000381] RE: CEAP Chamado
To: Simone Possedente de Lira <splira@usp.br>

A Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa (CEAP) confirma recebimento de sua solicitação. Um tíquete foi criado para acompanhamento do serviço. Por favor, aguarde as próximas notificações.

Enviado segunda-feira, 23 Outubro, 2023 - 17:28

Nome completo do docente/pesquisador: Simone Possedente de Lira
Nro. USP: 1882809
E-mail: splira@usp.br [1]
Telefone: 19996919779
Celular: 19996919779
Tipo de requerimento: Emissão de parecer de Mérito Ambiental (projeto individual)
Departamento: Ciências Exatas
Laboratório: Microbiologia e Química de Produtos Naturais
Detalhamento de atividades:
<https://pipoca.esalq.usp.br/webOS/sites/default/files/webform/ceap/CEAP-...>
[2]
Projeto de pesquisa:
<https://pipoca.esalq.usp.br/webOS/sites/default/files/webform/ceap/CEAP-...>
[3]
Certificado de treinamento de usuário e agente multiplicador:
Declaração de Responsabilidade: Estou ciente do Termo de Responsabilidade do Pesquisador

[1] <mailto:splira@usp.br>
[2] <https://pipoca.esalq.usp.br/webOS/sites/default/files/webform/ceap/CEAP-detativ-33892.pdf>
[3] <https://pipoca.esalq.usp.br/webOS/sites/default/files/webform/ceap/CEAP-projpesq-33892.pdf>

Atenciosamente,
Serviço de Apoio a Pesquisa
Fone: (19) 3429-4400