



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Fundação Universidade Federal do ABC
Gabinete da Reitoria
Assessoria de Cooperações Institucionais e Convênios

PLANO DE TRABALHO ADITIVO

Coordenador (a): Célio Fernando Figueiredo Angolini

Unidade demandante: CCNH

Categoria:	<input type="checkbox"/>	Ensino
	<input type="checkbox"/>	Pesquisa
	<input type="checkbox"/>	Extensão
	<input type="checkbox"/>	Desenvolvimento Institucional ¹
	<input checked="" type="checkbox"/>	Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Estímulo à Inovação

1. TÍTULO DO PROJETO:

Estudo de caracterização metabólica de cepas de Bacillus de interesse agrônomico

¹ Lei nº 8.958/1994, art. 1, § 2º É vedado o enquadramento, no conceito de desenvolvimento institucional, de:

I - atividades como manutenção predial ou infraestrutural, conservação, limpeza, vigilância e reparos;

II - serviços administrativos, como copeiragem, recepção, secretariado, serviços na área de informática, gráficos, reprográficos e de telefonia, demais atividades administrativas de rotina, e respectivas expansões vegetativas, inclusive por meio do aumento no número total de funcionários; e

III - realização de outras tarefas que não estejam objetivamente definidas no Plano de Desenvolvimento Institucional da UFABC.

Av. dos Estados, 5001 · Bairro Santa Terezinha · Santo André - SP · CEP 09210-580

Bloco A · Torre 1 · 1º andar · Fone: (11) 3356.7550/7549

convenios@ufabc.edu.br

versão: setembro/2020

2. OBJETO:

Caracterização de metabólitos produzidos por diferentes cepas de *Bacillus sp.* Em diferentes técnicas de cultivo *in vitro*. Caracterização de efeito inibitório em patógenos agrícolas do gênero *Colletotrichum*, *Corynespora*, *Sclerotinia* e *Rhizoctonia*.

3. APRESENTAÇÃO:

As plantas apresentam um papel central na maioria dos ecossistemas e por isso desenvolveram naturalmente ao longo dos anos uma gama de interações mediadas quimicamente com a comunidade heterotrófica ao seu redor. (MITCHEL-OLDS, *et al.*, 1998) Nos últimos anos a produção agrícola que depende de uma variedade de defensivos químicos utilizados para o controle de ervas-daninhas, insetos e doenças causadas por microrganismos tem alterado drasticamente essas interações, mesmo antes que possamos entendê-las. Evidências acumuladas nas últimas décadas indicam que o uso indiscriminado desses defensivos químicos tem se tornado uma grande ameaça a nossa habilidade de manter uma produção agrícola sustentável no futuro. (ALTIERI, *et al.*, 1995 and CAMPOS, *et al.*, 2018).

Nesse contexto, abordagens mais ecológicas no manejo agrícola e no controle de pragas vem se destacando; como o uso da alelopatia. A alelopatia é um fenômeno em que biomoléculas produzidas por um organismo (e.g. plantas, algas, bactérias e fungos) influenciam o crescimento, desenvolvimento, e reprodução de outros organismos. Essas biomoléculas são denominadas aleloquímicos e podem ser benéficos (alelopatia positiva) ou deletérios (alelopatia negativa), e em geral são metabólitos secundários que não são necessários ao metabolismo basal dos organismos alelopático. (WILLIS, *et al.*, 1998) Bactérias formadoras de endósporos apresentam uma série de vantagens quando se trata de sua utilização para formulação de produtos para aplicação agrícola (PÉREZ-GARCÍA *et al.*, 2011). Dentre outros mecanismos, algumas destas bactérias produzem uma gama de compostos inseticidas e antimicrobianos além de promover crescimento vegetal e induzir respostas de defesa na planta hospedeira (FRANCIS *et al.*, 2010). Em especial, espécies do gênero *Bacillus* são capazes de produzir endósporos, estruturas resistentes à condições abióticas adversas, provendo maior flexibilidade para formulação e, conseqüentemente, representam a classe mais importante de produtos comerciais microbiológicos para uso fitossanitário (FRAVEL *et al.*, 2005; JACOBSEN *et al.*, 2004).

As bactérias do gênero *Bacillus* pertencem ao grupo de microrganismos que dispõe de mecanismos de promoção de crescimento vegetal via biofertilização ou promoção de crescimento direta. Através da biofertilização estes microrganismos aumentam a biodisponibilidade de componentes essenciais e aumentam o fornecimento de nutrientes minerais para a planta (PÉREZ-GARCÍA *et al.*, 2011). Ademais, a promoção de crescimento vegetal direta por *Bacillus* envolve a modulação do desenvolvimento vegetal através da produção de fitormônios ou precursores destes (TSAVKELOVA *et al.*, 2006).

Entretanto, a aplicação agrícola mais relevante para este grupo de bactérias se dá por sua utilização como agentes de controle biológico, majoritariamente representada pela utilização da bactéria *Bacillus thuringiensis* e de seus mecanismos bioinseticidas (THAKORE *et al.*, 2006) mas não se restringindo à esta espécie (FRAVEL *et al.*, 2005). Neste sentido, o principal mecanismo de biocontrole se dá por antagonismo, alcançado via produção de enzimas de degradação de parede celular (SHODA *et al.*, 2000) e lipopeptídeos antibióticos (iturinas, fengicinas ou surfactinas) (ONGENA & JACQUES, 2008) que, além da atividade antimicrobiana, também estão envolvidos

com a indução da resistência sistêmica vegetal (CHOUDHARY & JOHRI, 2009). Isolados de *Bacillus amyloliquefasciens* têm sido reportados como agentes de controle biológico expressivos, apresentando antagonismo por produção de lipopeptídeos (CHOWDHURY *et al.*, 2015) além de estudos indicando sua ação como rizobactéria promotora de crescimento de plantas (PGRP) (IDRIS *et al.*, 2007).

4. JUSTIFICATIVA:

O potencial de bactérias do gênero *Bacillus* na agricultura é incontestável e, neste sentido, estudos de caracterização molecular de mecanismos de ação destas bactérias podem fornecer informações para o desenvolvimento de tecnologias otimizadas para o aumento de produtividade. Agentes de controle biológico apresentam esta atividade por diversos mecanismos, principalmente, via produção de metabólitos secundários como, por exemplo, moléculas do grupo das surfactinas. Assim, a caracterização da produção destes metabólitos permite, a longo prazo, desenvolver processos que otimizem a produção destes metabólitos e, conseqüentemente, novos produtos com atividade incrementada.

5. OBJETIVOS:

Caracterização química dos extratos de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* utilizando espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida. Caracterização química dos ensaios de co-cultivo entre *Bacillus amyloliquefasciens* e *Bacillus velezensis* vs. patógenos agrícolas (*Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora casiiicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*). Caracterização dos efeitos inibitórios via testes de inibição *in vitro*. Realização do imageamento molecular por MS da cepa de *Bacillus* que apresentar melhor resultado.

6. METODOLOGIA:

Caracterização dos estratos: será usado como ferramenta a espectrometria de massas aliada com o “molecular networking”, um software que auxilia na interpretação dos resultados. Nesta abordagem o trabalho é dividido em três passos: elaboração dos cultivos de microrganismos, aquisição dos espectros de MS/MS, identificação dos metabólitos através do “molecular networking”. Para obtenção dos dados de MS/MS, diversas técnicas poderão ser utilizadas, mas de modo geral a técnica de ionização por *eletrospray* (ESI) por ser mais abrangente para moléculas de média a alta polaridade são preferíveis. Ainda dependendo da complexidade da amostra, a utilização de uma separação por cromatografia líquida (LC) pode ser necessária, para se recuperar o máximo de informações desses extratos.

Sendo assim, utilizando a plataforma online do “Global Natural Products Social Molecular Networking” (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>) será gerado o ‘molecular networking’ de cada caso estudado. A ferramenta funciona organizando grandes base de dados de espectros de MS/MS de acordo com sua similaridade nos padrões de fragmentação de diferentes íons precursores.

Inicialmente o algoritmo simplifica os dados através da criação de espectros combinados representativos para cada íon precursor (consensus spectra), diminuindo assim a redundância dos dados e reduzindo o tempo computacional. Estes espectros são então usados para a geração do *networking*, onde são agrupados de acordo com a similaridade que é determinada pelo vetor de similaridade ‘cosine’. O vetor de similaridade é calculado pra todos os espectros que compartilhem um número pré-determinado de íons fragmentos, usando-se as informações de intensidades relativas e as diferenças de *m/z* dos precursores e dos fragmentos (*neutral loss*). Em seguida o ‘molecular networking’ é construído levando em consideração esses fatores. Com essa rede torna-se muito mais fácil a análise dos dados, pois a remoção de moléculas dos controles e de constituintes do meio de cultivo se torna mais fácil, e devido a formação de cluster por similaridade a descoberta de análogos também é facilitada.

Ensaio antimicrobiano e antifúngico: Plantas são susceptíveis a infecções e como elas não possuem um sistema imune baseado em células, substâncias que atuam como antibióticos ou antifúngicos proporcionam um excelente mecanismo de combate a essas infecções. Antibióticos são substâncias químicas que podem ser produzidas por microrganismo e têm a capacidade de inibir o crescimento ou destruir outros organismos. Uma maneira de se buscar esses antibióticos na natureza é através dos ensaios antimicrobianos, vários ensaios podem ser utilizados e devem ser modificados de acordo com as necessidades para que os experimentos se aproximem do natural. Os ensaios mais utilizados são os métodos de difusão, diluição em caldo e ensaios de competição.

Métodos de difusão: São métodos físicos na qual um microrganismo é desafiado num meio sólido frente a um extrato ou substância purificada, diversos métodos são utilizados (difusão em disco, perfuração em ágar, bioautografia, etc.). Contudo, modificações serão necessárias porque no campo o desenvolvimento desses microrganismos não ocorrerá em meios a base de ágar e sim no solo ou até mesmo em órgãos na própria planta.

Métodos de diluição em caldo: nesses métodos considera-se a relação entre a proporção do crescimento do microrganismo desafiado pela concentração da substância utilizada. A determinação do crescimento microbiano pode ser feita por medida de leitura óptica, ou contagem em câmara de Neubauer e os ensaios podem ser feitos em escala macro (tubos de ensaios) ou micro (placas de 96 poços). Estes métodos podem ser utilizados nos estudos *in vitro* para a caracterização das moléculas alvo, contudo como a ideia final é o uso do próprio microrganismos como AGC, ensaios como os de competição (co-cultivo) são mais adequados.

Ensaio de competição (patógeno vs. endofíticos): Nesses ensaios co-cultivos interespecies serão realizados em ágar, onde espera-se proporcionar condições de estresse durante o crescimento dos microrganismos e propiciar uma maior produção dos metabólitos de interesse, uma vez que muitas vezes a produção destes só é observada como resposta a algum estímulo ambiente, o qual não é encontrado em um cultivo isolado. Novamente, apesar dos ensaios iniciais serem realizados em ágar, posteriormente ensaios desenvolvidos na próprio nicho ecológico (folhas, raízes, etc) terão que ser desenvolvidos, visando mimetizar o encontrado no ambiente natural.

O melhor tipo de ensaio será escolhido de acordo com os resultados preliminar obtidos nos co-cultivos entre Bacillus e patógeno.

Imagiamento por espectrometria de massas (IMS): Além da caracterização dessas moléculas é interessante se ter informações a respeito da sua distribuição espacial e abundância nos fenômenos estudados, nesse cenário a IMS é uma excelente ferramenta, pois além das análises de MS/MS necessárias para geração do ‘molecular networking’ é possível também obter as

distribuições espaciais de cada molécula (ou razão m/z) sobre a superfície analisada. Diferentes técnicas podem ser utilizadas para obter-se o IMS, porém para as moléculas do metabolismo secundário que são no geral polares e de baixo a médio peso molecular (100-2000 Da) a DESI (desorption electrospray ionization) e a MALDI são as mais adequadas. Descrita pela primeira vez por Cooks e colaboradores em 2004, a DESI possibilita análises em condições ambientes sem a necessidade de um preparo prévio da amostra. O processo de geração de íons ocorre através da incidência direta sobre a superfície da amostra de gotículas de solvente carregadas, as moléculas são então desorvidas e ionizadas, quando ainda a amostra está sobre uma plataforma móvel permite-se criar as imagens moleculares. Até o momento diversas adaptações da técnica já foram realizadas permitindo a análise direta das mais diferentes amostras, inclusive a análise direta de cultivos microbianos no próprio ágar, metodologia que adaptei durante meu pós-doutoramento no laboratório Thomson de espectrometria de massas do IQ-UNICAMP.

7. METAS, ETAPAS, ATIVIDADES, INDICADORES:

1 – Caracterização dos extratos de *B. subtilis* e *B. licheniformis*

1.1 Realização dos cultivos dos microrganismos em laboratório

1.2 Extração dos ensaios

1.3 Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

2 – Caracterização dos ensaios de co-cultivo dos *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus velezensis*

2.1 Realização dos ensaios de cocultivo frente aos patógenos (*Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora casicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*)

2.2 Seleção dos dois patógenos que apresentaram melhores resultados

2.3 Avaliar a alteração metabólica dos *Bacillus* frente aos patógenos (LC-MS)

2.4 Avaliar o efeito de inibição dos extratos frente aos patógenos (Difusão em ágar ou diluição em caldo)

2.5 Análise de imageamento do melhor ensaio de co-cultivo (*Bacillus* x patógeno)

3 – Isolamento e caracterização dos metabólitos do *Bacillus amyloliquefaciens* por RMN

3.1 Realização dos cultivos dos microrganismos em laboratório em larga escala

3.2 Extração dos ensaios

3.3 Purificação dos metabólitos

3.4 Análise por RMN e interpretação dos dados

8. INDICADORES:

Ter a caracterização dos extratos de 1 extrato de cada um dos microrganismos avaliados *B. subtilis* e *B. licheniformis*. Totalizando 4 extratos.

9. PRAZO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

9.1. Período vigente de 07/2020 a 07/2021:

METAS	ETAPAS	Bimestres					
		1	2	3	4	5	6
2	2.1	■					
	2.2 e 2.3	■	■				
	2.4			■			
	2.5				■		
1	1.1				■		
	1.2					■	
	1.3					■	■
Relatórios			■			■	

9.1. Período do aditivo de 07/2021 a 03/2022:

METAS	ETAPAS	Bimestres			
		7	8	9	10
3	3.1	■			
	3.2	■	■		
	3,3			■	
	3.4				■

6

10. ACOMPANHAMENTO:

Entrega de relatórios semestrais de execução durante a vigência do projeto, incluindo o período do aditivo, e um relatório técnico final no término do projeto.

11. RESULTADOS ESPERADOS:

Com os dados fornecidos a Agrivalle poderá caracterizar e entender melhor o funcionamento de alguns de seus microrganismos que atuam como agentes de controle biológico de pragas agrícolas.

11.1 PROPRIEDADE INTELECTUAL

Marque todos os resultados passíveis de obtenção de propriedade intelectual que se tem a expectativa ou possibilidade de se obter com o projeto²:

<input checked="" type="checkbox"/>	Relatórios, documentos, artigos científicos, dissertações ou teses;
<input type="checkbox"/>	Produtos e/ou métodos tecnológicos;
<input type="checkbox"/>	Programas de Computador, aplicativos, algoritmos, sistemas, plataformas digitais;
<input checked="" type="checkbox"/>	Conhecimentos técnicos passíveis de utilização industrial (<i>know how</i>);
<input type="checkbox"/>	Cultivares;
<input type="checkbox"/>	Topografia de Circuitos Integrados;
<input type="checkbox"/>	Obras artísticas;
<input type="checkbox"/>	Outros (descreva):
<input type="checkbox"/>	O projeto não envolve a possibilidade a obtenção de nenhum resultado passível de obtenção de propriedade intelectual.

² Consultar site da InovaUFABC: <http://inova.ufabc.edu.br/propriedade-intelectual>

12. EQUIPE DO PROJETO

12.1 Período vigente de 07/2020 a 07/2021:

EQUIPE TÉCNICA *							
Nome	CPF	SIAPE	Vínculo empregatício e Instituição	Função no Projeto	Carga Horária Total	Duração da participação (meses)	Valor Total (quando envolver pagamento)
Célio Fernando Figueiredo Angolini	32520206888	305857	Docente UFABC	Coordenação Geral	2h/mensais	12	R\$0,0
Fernanda Silva Ribeiro	427.000.078-32		PC UFABC	Elaboração dos experimentos	20h/semanais	4	R\$0,00
Isabella Takahashi Kitano	05115106167	-	Analista de P&D Agrivalle	Auxílio técnico		12	R\$0,0

12.2 Período do aditivo de 07/2021 a 03/2022:

EQUIPE TÉCNICA *							
Nome	CPF	SIAPE	Vínculo empregatício e Instituição	Função no Projeto	Carga Horária Total	Duração da participação (meses)	Valor Total (quando envolver pagamento)
Célio Fernando Figueiredo Angolini	32520206888	305857	Docente UFABC	Coordenação Geral	2h/mensais	8	R\$0,0
Fernanda Silva Ribeiro	427.000.078-32		PC UFABC	Elaboração dos experimentos	20h/semanais	8	R\$8.400,00
Isabella Takahashi Kitano	05115106167	-	Analista de P&D Agrivalle	Auxílio técnico		8	R\$0,0

12.3 – Dados do Coordenador:

DADOS DO COORDENADOR:

Nome completo: Célio Fernando Figueiredo Angolini

CPF:325.202.068-88

Centro: CCNH

Endereço do Coordenador na UFABC: Campus Santo André, Bloco B, Sala 1016

Telefones fixo e celular: (11) 4996-0009 (19) 97110-3990

E-mail:celio.fernando@ufabc.edu.br



13. PREVISÃO ORÇAMENTÁRIA

13.1 O valor total para realização do projeto vigente é de R\$ 18.000,00 e, durante o período de vigência, de 07/2020 a 07/2021, serão utilizados o montante de R\$2.984,84, conforme aplicação abaixo:

ITENS DE DESPESA	VALOR (R\$)
MATERIAL DE CONSUMO	
Material de consumo nacional	R\$2.736,65
CUSTO OPERACIONAL ADMINISTRATIVO	
Custo Operacional Fundep (quando aplicado) até 10%	R\$243,27
RECOLHIMENTO VIA GRU – RESOLUÇÃO DA UFABC	
Tarifas bancárias	R\$4,92
TOTAL	R\$2.984,84

13.2 O valor residual de R\$ 15.015,16, para o período do aditivo, será utilizado, conforme aplicação abaixo:

ITENS DE DESPESA	VALOR (R\$)
PESSOA FÍSICA	
Bolsa de Pesquisa	R\$8.400,00
MATERIAL DE CONSUMO	
Material de consumo nacional	R\$718,43
MATERIAL PERMANENTE E EQUIPAMENTOS	
Equipamento Nacional	R\$1.000,00
Material Permanente Nacional	R\$1.800,00
PESSOA JURÍDICA	
Exemplo: Serviços gráficos (faixas, banners, folders e panfletos)	R\$100,00
CUSTO OPERACIONAL ADMINISTRATIVO	
Custo Operacional Fundep (quando aplicado) até 10%	R\$1.556,73
RECOLHIMENTO VIA GRU – RESOLUÇÃO DA UFABC	
UFABC (até 18% sobre o Custo Total do Projeto)	R\$1.440,00
TOTAL	R\$15.015,16

DADOS DO PARCEIRO:

Razão Social: Agrivalle Brasil Indústria e Comércio de Produtos Agrícola LTDA

CNPJ: 05.470.581/0001-49

Nome do contato: Iron Amoreli de Figueiredo Ribeiro

Telefone: (19) 971053941

E-mail: iron.amoreli@agrivalle.com.br

Endereço do contato: Avenida Tranquillo Giannini, nº 1.090

14. GESTÃO ADMINISTRATIVA E FINANCEIRA

A Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa – FUNDEP – realizará o apoio administrativo e financeiro ao projeto, conforme detalhamento descrito no instrumento de parceria.

14.1 PRESTAÇÃO DE CONTAS

A prestação de contas pela fundação gestora se dará conforme determinado pelo Decreto nº 7.423/10 em seus artigos 11º e 12º.

A prestação de contas/relatório de execução final será apresentada pelo Coordenador do Projeto, nos termos da Resolução da CPCo nº 01/2014.

15. CONCLUSÃO


Esse projeto trata-se da continuidade de uma parceria entre a UFABC e a Agrivalle, no qual será possível realizar a caracterização de produtos da empresa. Informações estas que irão ajudar o entendimento do uso de microrganismos no controle de algumas pragas agrícolas.





16. APROVAÇÃO NA INSTITUIÇÃO

Este projeto foi aprovado pelo Conselho do Centro _____ em ____/____/____.

17. DECLARAÇÕES COORDENADOR DO PROJETO

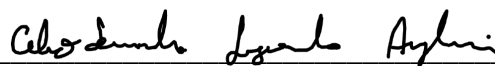
Rubrica:  Coordenador do Projeto: Declaro ciência e observância quanto ao disposto no art. 7º, §7º da Resolução ConsUni nº 73/2011: É vedada a participação de familiares do coordenador nos projetos, tais como: cônjuge, companheiro ou parentes em linha reta ou colateral, até o terceiro grau, salvo ocorra processo seletivo que garanta a isonomia entre os concorrentes e as situações previstas na legislação que vetem o nepotismo no âmbito da Administração Pública Federal.

Rubrica  Coordenador do Projeto: Declaro ciência e observância quanto ao disposto no art. 7º da Resolução ConsUni nº 73/2011: Os projetos devem ser realizados por, no mínimo, dois terços de pessoas vinculadas à UFABC, incluindo docentes, técnicos administrativos, alunos regulares, pesquisadores de pós doutorado e bolsistas com vínculo formal a programas de pesquisa da UFABC.

Rubrica  Coordenador do Projeto: Declaro que a metodologia aplicada no desenvolvimento do Projeto atende as recomendações éticas disciplinadas pelas Comissões Assessoras do CONSEPE, relacionadas no seguinte *link*:

<http://www.ufabc.edu.br/administracao/conselhos>

Santo André, 15 de março de 2021.



Célio Fernando Figueiredo Angolini



Ronei Miotto
Diretor do CCNH/UFABC

Portaria nº 393, D.O.U. 29/11/2017
Dirigente da Unidade Demandante