



**Constituintes Químicos e Atividade Antifúngica de Extratos do Fungo *Calonectria sp*. contra o fungo *Hemileia vastatrix*, causador da ferrugem-do-café**

**Gustavo S. F. De Souza¹ (PG), Bruno W. Ferreira2 (PG), Cristiane A. Franco1 (PG), Matheus S. Mendonça1 (G), Laura Saavedra-Tobar2 (PQ), Jodieh O. S. Varejão1 (PQ), Robert W. Barreto2 (PQ), Eduardo V. V. Varejão1\* (PQ),**

¹ Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa. Av PH Rolfs s/n, 36570-900, Viçosa-MG

2 Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa. Av PH Rolfs s/n, 36570-900, Viçosa-MG

\*eduardo.varejao@ufv.br



RESUMO - No presente trabalho, foi demonstrado que o fungo *Calonectria hemileiae*, identificado como micoparasita do fungo *Hemileia vastatrix*, produz e secreta metabólitos capazes de interferir na germinação de urediniósporos do fungo hospedeiro. O filtrado de meio de cultura de Calonectria hemileiae e o seu extrato em acetato de etila inibiram em 100% a germinação de *H. vastatrix*. O extrato apresentou valor de IC50 de 186,6 ± 6,0 µg mL-1. Compostos identificados por CG-EM foram testados sobre a germinação de urediniósporos de *H. vastatrix*. Ácido benzóico e ácido fumárico, a 500 µmol L-1, inibiram em 100% e 62% a germinação. Os resultados permitem concluir que o filtrado de cultura, extratos orgânicos e metabólitos produzidos por *C. hemileiae*, apresentam potencial para o desenvolvimento de agentes antifúngicos naturais que poderão contribuir para o controle biológico da ferrugem do café.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_



*Palavras-chave: biofungicidas, pesticidas, controle natural, café.*

*\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_*



**Introdução**

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o estado de Minas Gerais vem se mantendo como maior produtor de café no Brasil (1). O fungo *Hemileia vastatrix*, causador da ferrugem do café, é considerado mundialmente como o principal fator biótico limitante à produção da cultura cafeeira, podendo levar a prejuízos de até 90% da produção (2). Os fungicidas utilizados para prevenção ou tratamento da doença apresentam elevada toxicidade para organismos não-alvo (3). O controle biológico, quer através da aplicação de microrganismos antagonistas ou de metabólitos secundários, tem ganhado cada vez mais importância como estratégia ambientalmente segura para o controle das pragas agrícolas. O fungo *Calonectria hemileiae* foi identificado como micoparasita de *H. vastatrix*. Foi observado que *C. hemileiae* foi capaz de inibir a germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* em mais de 80% e de reduzir a severidade da doença em até 90%. O objetivo do presente trabalho foi produzir extratos de cultura de *C. hemileiae*, avaliar a atividade dos extratos quanto à inibição da germinação de urediniósporos de *H. vastatrix*, identificar metabólitos constituintes dos extratos através de análises por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas e avaliar a atividade antifúngica de metabólitos.

**Experimental**

*Cultivo do fungo e obtenção de extratos*

*C. hemileiae* foi cultivado em câmara climática, utilizando meio de cultura batata dextrose-ágar, a 22 ± 2 ºC por 7 dias, sob fotoperíodo de 12 h.

As culturas foram incubadas em agitador rotativo a 140 rpm, a 23 ºC no escuro por 14 dias. Ao final, o micélio fúngico foi removido por filtração a vácuo e o meio aquoso foi extraído sucessivamente com hexano, diclorometano e acetato de etila [2:1 (v/v) solvente/filtrado, 3x cada solvente]. Os extratos foram secos sob sulfato de sódio anidro e os solventes foram removidos em evaporador rotativo a 40ºC, fornecendo os extratos em hexano (EHx, X g), diclorometano (DCM, xg) e acetato de etila (AcOEt, x g).

*Análises por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).*

As análises por CG-EM foram realizadas em equipamento Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, nas seguintes condições operacionais: método por impacto de elétrons (70 eV); modo scan, m/z 45,00 a 700,00; coluna capilar Ultra Alloy 5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm); volume de injeção da amostra 1,0 μL fluxo do gás de arraste (He) 1,6 mL min-1; razão de split 1:10; temperatura do injetor 290 ºC; temperatura do detector 290 ºC;, temperatura da coluna 40 ºC por 2 min., gradiente de 5 ºC por min até 290 ºC, mantida por 10 min. Antes da análise, o extrato em acetato de etila extrato foi derivatizado por sililação utilizando piridina anidra see N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA). Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos espectros de massas com aqueles existentes no banco de dados do equipamento. Apenas compostos cujos espectros de massas apresentaram pelo menos 90¨de similaridade com os dados das bibliotecas (NIST14 e Wiley7) do equipamento foram considerados como identificados.



*Avaliação das atividades sobre a germinação de urediniósporos de H. vastatrix.*

O filtrado de cultura, os seus extratos e os metabólitos majoritários do extrato ativo foram testados quanto à inibição da germinação de esporos de *H. Vas*tatrix. O filtrado foi testado *in natura*. Os extratos e os compostos puros foram dissolvidos em solução aquosa de Tween 20 a a 1% (m/v). 10 µL de soluções de cada extrato e 10 µL de suspensão aquosa contendo 106 esporos mL-1 em Tween 20 a 1% (m/v) foram misturadas e transferidas para lâmina de vidro esterilizada, produzindo concentração final de 250 µg mL-1 para todos os extratos. As lâminas foram acondicionadas em caixas Gerbox® e incubadas no escuro, a 22 ± 1 °C, por 6 horas. A germinação dos urediniósporos foi interrompida pela adição de 10 µL de lactofenol. Solução aquosa de Tween 20 a 1% (m/v) e oxicloreto de cobre foram usados ​​como controles negativo e positivo, respectivamente. A porcentagem de germinação dos urediniósporos foi determinada utilizando o microscópio óptico e resultados foram expressos como porcentagem de inibição de germinação em relação ao controle negativo. Os tratamentos foram comparados utilizando o teste de Scott-Knott ( p < 0,05). Os extratos ativos foram testados em diferentes concentrações ( 12,5 a, 175 µg mL-1) para construção de curvas de dose-resposta e os valores de concentração capazes de inibir em 50% a germinação de esporos (IC50) foram calculados a partir de regressão não linear usando GraphPad Prisma 1. Os testes foram realizados em cinco repetições. Os compostos identificados como majoritários no extrato ativo foram testados a 500 µmol L-1 nas mesmas condições experimentais.

**Resultados e Discussão**

O extrato do filtrado de cultura obtido AcOEt, a 250 µg mL-1 , inibiu em 100% a germinação de urediniósporos de *H. vastatrix*. O efeito produzido pelo extrato está representado na Figura 1.



**Figura 1**. Fotos (obtidas em microscópio óptico) das lâminas de teste de atividade inibitória sobre a germinação de urediniósporos de *H. vastatrix*

A curva de dose resposta para o extrato em AcOEt é apresentada na Figura 2. O valor de IC50 do extrato foi determinado como 186,6 ± 6,0 µg mL-1, enquanto do oxicloreto de cobre, fungicida comercial utilizado como controle positivo, foi de 5,3 ± 0,5 µg mL-1.

As análises por CG-EM revelaram a presença de uma grande quantidade de metabólitos. Ácido benzóico, ácido succínico, apresentaram maiores valores de porcentagens relativas e foram submetidos a testes biológicos.





**Figura 2.** Curva de dose-resposta para o extrato em acetato de etila.

Na concentração de 500 µmol L-1, ácido benzóico e ácido fumárico inibiram em 100% e 62% a germinação de urediniósporos de *H. Vastatrix*, respectivamente.

Muitos compostos detectados no extrato não puderam ser identificados por comparação do seus espectros de massas com dados da biblioteca do equipamento. Isto indica que trabalhos futuros apresentam potencial para a descoberta de outros compostos envolvidos no antagonismo de *C. Hemileiae* contra H. Vastatrix, compostos esses que poderão constituir novos fungicidas naturais ou servir de modelo para a síntese de análogos bioativos.

**Conclusões**

O fungo *Calonectria hemileiae*, micoparasita de *Hemileia vastatrix*, produz metabólitos secundários capazes de inibir a germinação de urediniósporos do fungo hospedeiro. Filtrados de cultura, extratos e metabólitos apresentam potencial para o desenvolvimento de agentes antifúngicos naturais que poderão contribuir para o controle biológico da ferrugem do café. Muitos compostos detectados por CG-EM no extrato não puderam ser identificados por comparação do seus espectros de massas com dados da biblioteca do equipamento. Trabalhos futuros poderão levar à identificação de novas estruturas químicas como modelos para o desenvolvimento de novos agentes para o controle da ferrugem do café.

**Agradecimentos**

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo 401785/2023-8), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (APQ-01414-24) e à coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

**Referências**

1. L.R. Galvão; J.S.S. Bueno Filho; A.K. Alves; C.P. Chain, *Res. Soc. Dev*. **2022**, 11, e39611629264

2. R. Borjas-Ventura; L. Alvarado-Huaman; V. Castro-Cepero; D. Rebaza-Fernández; L. Gómez-Pando; A. Julca-Otiniano, *Agronomy* **2020**, 10, 1867.

3. X. Wang; X. Li; Y. Wang; Y. Qin; B. Yan; C.J. Martyniuk, *Environ. Pollut*. **2021**, 15, 116671.

4. S. Salcedo-Sarmiento; C.E. Aucique-Pérez; P.R. Silveira, A.A. Colmán, A.L. Silva, P.S.C. Mansur, F.A. Rodrigues, H.C. Evans, R.W. Barreto, *iScience* **2021**, 24, 102352.