



**SEGUNDO TERMO ADITIVO AO ACORDO DE PARCERIA Nº 03/2021 – UFLA, QUE ENTRE SI CELEBRAM A UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – UFLA, A KLABIN S.A. E A FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E CULTURAL - FUNDECC, NA FORMA ABAIXO.**

Pelo presente Instrumento e na melhor forma de direito, a **UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS**, pessoa jurídica de direito público, autarquia especial integrante da Administração Indireta da União, vinculada ao Ministério da Educação, criada pela Lei nº 8.956, de 15 de dezembro de 1994, inscrita no CNPJ sob o nº 22.078.679/0001-74, com sede na cidade de Lavras, Estado de Minas Gerais, Campus Universitário, doravante denominada **UFLA**, neste ato representada por seu Vice-reitor, **Sr. JACKSON ANTONIO BARBOSA**, nomeado pela Portaria Reitoria nº 294, de 6 de maio de 2024, publicada no DOU de 07/05/2024, Pagina 19, Seção 2, considerada a delegação de competência outorgada por meio da Portaria Reitoria nº 625, de 17 de junho de 2024; a empresa **KLABIN S.A.**, pessoa jurídica de direito privado, inscrita no CNPJ sob o nº 89.637.490/0001-45, NIRE nº 35300188349, com sede na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, na Avenida Brigadeiro Faria Lima, nº 3600, CEP 04538-132, neste ato representada por seus Procuradores, **Sr. FRANCISCO CESAR RAZZOLINI** e **Sr. BRUNO AFONSO MAGRO**; e a **FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E CULTURAL**, pessoa jurídica de direito privado, inscrita no CNPJ sob o nº 07.905.127/0001-07, com sede na cidade de Lavras, Estado de Minas Gerais, *Campus* da UFLA, credenciada como Fundação de Apoio pela Portaria MEC/MCTI/GAT nº 40, de 16/6/2017, publicada no *Diário Oficial* da União de 29/6/2017, Seção 1, página 8, e autorizada pela Resolução CUNI/UFLA nº 051, de 19/11/2015, neste ato representada por sua Diretora Executiva, Professora **ANA PAULA PIOVESAN MELCHIORI**, resolvem celebrar o presente **SEGUNDO TERMO ADITIVO AO ACORDO DE PARCERIA Nº 03/2021**, que será regido pelas normas legais vigentes no Marco Legal de Ciência, Tecnologia e inovação (Emenda Constitucional nº 85/2015, Lei nº 10.973/2004, Lei nº 13.243/2016, Decreto nº 9.283/2018 e Lei nº 8.958/1994) e pelas demais normas legais pertinentes à matéria, bem como pelas cláusulas e condições a seguir estabelecidas:

**CLÁUSULA PRIMEIRA – DO OBJETO**

O presente Segundo Termo Aditivo ao Acordo de Parceria nº 03/2021 tem por objeto a prorrogação da vigência do Acordo por 12 (doze) meses, estendendo-a de 04/02/2025 até 04/02/2026, a majoração de seu valor em R\$ 132.137,00 (cento e



FCR

MB

MB

FO

MB

HB



trinta e dois mil cento e trinta e sete reais), e a substituição do seu Plano de Trabalho, passando as Cláusulas 4 e 12 a vigorarem com as seguintes redações, respectivamente:

#### **4. CLÁUSULA QUARTA – DOS RECURSOS FINANCEIROS**

4.1 A KLABIN transferirá à FUNDECC recursos financeiros no valor total de R\$ 664.274,00 (seiscentos e sessenta e quatro mil, duzentos e setenta e quatro reais), conforme cronograma de desembolso constante do Plano de Trabalho, anexo a este Acordo.

4.2 As partes declaram que R\$ 400.000,00 (quatrocentos mil reais) já foram transferidos nos primeiros 36 meses de vigência, por meio do pedido 4502811907, conforme cronograma de desembolso constante do Plano de Trabalho, anexo a este Acordo.

#### **12. CLÁUSULA DÉCIMA SEGUNDA - DA VIGÊNCIA E DA PRORROGAÇÃO**

12.1. O presente Acordo vigorará pelo prazo de sessenta meses, a partir da data de sua última assinatura, prorrogáveis.

12.2. Este Acordo poderá ser prorrogado por meio de termo aditivo, com as respectivas alterações no Plano de Trabalho, mediante a apresentação de justificativa técnica.

#### **CLÁUSULA SEGUNDA – DA RATIFICAÇÃO**

As demais cláusulas e condições do Acordo de Parceria nº 03/2021 e de seus termos aditivos, que aqui não foram expressamente alteradas, permanecem em pleno vigor.

#### **CLÁUSULA TERCEIRA – DA PUBLICAÇÃO**

Caberá à UFLA providenciar a publicação deste Termo Aditivo ao Acordo de Parceria nº 03/2021, por extrato, no Diário Oficial da União.

E como prova de assim haverem livremente pactuado, os Partícipes assinam o presente instrumento, reconhecendo, desde já, a veracidade, autenticidade, integridade e eficácia deste Acordo de Parceria nº 03/2021, nos termos do artigo 219 do Código Civil, em formato eletrônico e/ou assinados pelas partes por meio da plataforma digital DocuSign ou através de certificados eletrônicos, ainda que sejam certificados eletrônicos não emitidos pela ICP-Brasil, nos termos do art. 10, §2º, da Medida Provisória nº. 2.200-2, de 24 de agosto de 2001.

Lavras, data da assinatura eletrônica.

Pela UFLA:





UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS  
Coordenadoria de Parcerias Acadêmicas – CPAR/DPI/PROPLAG

**JOSÉ ROBERTO SOARES SCOLFORO**  
Reitor da UFLA

Pela **KLABIN**:

*Francisco C. Razzolini*  
**FRANCISCO CESAR RAZZOLINI**  
Procurador

**BRUNO AFONSO MAGRO**  
Procurador

Pela **FUNDECC**:

*Ana Paula P. Melchiori*  
**ANA PAULA PIOVESAN MELCHIORI**  
Diretora Executiva

*Jackson Antonio Barbosa*  
Jackson Antonio Barbosa  
Vice Reitor UFLA

FCR

MB

MB

FO

MB

HB





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – UFLA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO**  
**DIRETORIA DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA - DINTEC**  
 E-mail: dintec@ufla.br

# PROJETO

## Parceria com Repasse de Recursos Financeiros

### I – DADOS CADASTRAIS DO PROJETO

#### 1. TÍTULO DO PROJETO

Estratégias moleculares para o controle de formigas cortadeiras

#### 2. ÓRGÃO EXECUTOR

Departamento Entomologia/ Departamento Química

#### 3. ÁREA DE ABRANGÊNCIA

- |  |  |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa | <input checked="" type="checkbox"/> Inovação Tecnológica |
| <input type="checkbox"/> Extensão            | <input type="checkbox"/> Extensão Tecnológica            |
| <input type="checkbox"/> Ensino              | <input type="checkbox"/> Desenvolvimento Institucional   |

#### 4. RESUMO DO PROJETO

O objetivo da proposta é utilizar o transcriptoma da formiga cortadeira *A. sexdens* (sequências já obtidas pelo nosso grupo) como fonte de dados para a identificação e seleção de genes alvo candidatos ao silenciamento gênico mediado por RNAi e realizar bioensaios in vivo com larvas e formigas adultas empregando moléculas de dsRNA específicas aos alvos gênicos. Simultaneamente, objetiva-se conduzir experimentos com isolados de Bt potencialmente tóxicos às formigas, visando desenvolver estratégias moleculares de controle e manejo das pragas no campo. Paralelamente serão definidas condições de cultivo do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* e o seu sequenciamento.

#### 5. PARCEIRO(S) NO PROJETO

##### 5.1. CELEBRANTE 2

1. Tipo de participação Participe	2. Razão Social Universidade Federal de Lavras		
3. Endereço da sede (av., rua, nº, bairro) Campus Universitário		4. CNPJ/MF 22.078.679/0001-74	
5. Cidade/Estado Lavras – MG	6. CEP 37200-000	7. Telefone (35) 3829.1502	
8. Nome do representante legal José Roberto Scolforo		9. CPF/MF ***.081.007-**	
10. Cargo Reitor		13. Data venc. mandato 05/05/2028	





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – UFLA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO**  
**DIRETORIA DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA - DINTEC**

E-mail: dintec@ufla.br

### 5.2. CELEBRANTE 3

1. Tipo de participação Partícipe		2. Razão Social Klabin S. A.	
3. Endereço da sede (av., rua, nº, bairro) Avenida Brigadeiro Faria Lima nº 3.600 – 3º, 4º e 5º andares – Bairro Itaim Bibi			4. CNPJ/MF 89.637.490/0001-45
5. Cidade/Estado São Paulo-SP		6. CEP 04538-132	7. Telefone
8. Nome do representante legal CARLOS AUGUSTO SOARES DO AMARAL SANTOS			9. CPF/MF ***.236.188-**
10. Identidade nº *.559.***-7	11. Órgão Expedidor SSP/SP	12. Cargo Diretor	13. Data venc. mandato Indeterminado

## II – DESCRIÇÃO DO PROJETO

### 6. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das maiores áreas de florestas plantadas no mundo, sendo considerado um dos maiores produtores mundiais de celulose, carvão e madeira (BURATTO et al., 2012). No ano de 2016, a produção de celulose no Brasil cresceu cerca de 8 % em relação ao ano de 2015, levando o país à posição de 2º maior produtor de celulose mundial. Dentre as espécies arbóreas com maior área plantada destacam-se o eucalipto com, aproximadamente, 5,7 milhões de hectares plantados e o pinus com cerca de 1,6 milhões (IBÁ, 2017).

Mesmo com todo este crescimento, o setor florestal sofre com o ataque de diversas pragas, em especial as formigas cortadeiras, uma das principais pragas florestais na América Latina. As formigas cortadeiras atacam, principalmente, as culturas de pinus e eucalipto em todas as épocas do ano, provocando danos que levam a perdas diretas e indiretas, tais como a diminuição do tamanho das árvores e, conseqüentemente, a diminuição da resistência a outros insetos e patógenos (MARICONI, 1981; MANFRANGOLO et al., 2014). Estima-se que as perdas em madeira devido ao ataque de formigas cortadeiras estejam em torno de 14,5% da produção por hectare, no qual são necessárias uma faixa de 161 árvores de pinus e 86 de eucalipto para abastecer um saueiro durante um ano (FORTI, 2000).

As formigas cortadeiras podem ser encontradas desde o Sul dos Estados Unidos ao Centro da Argentina (DELABIE et al., 2011). Em seu habitat, exercem uma relação de simbiose com o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*, relação que é baseada especialmente na troca de nutrientes entre as formigas e o fungo (SCHADE, 1973; SIQUEIRA et al., 1998). Devido as grandes perdas causadas pelo ao ataque de formigas cortadeiras, o controle deste inseto-praga é de grande interesse do setor florestal. Os métodos mais comumente utilizados são os químicos, culturais, mecânico e biológicos, entretanto o método de maior destaque é o químico, baseado no uso de inseticidas e iscas tóxicas (ZANETTI et al., 2014).

Um dos principais desafios relacionados ao uso de inseticidas químicos é que estes são capazes de se acumular no meio ambiente e de atingir negativamente organismos não-alvo (BEDOR, 2009; XUE et al., 2012). Com o objetivo de reduzir a utilização de inseticidas químicos, formas alternativas de controle que sejam eficientes e mais sustentáveis que os métodos atuais vêm sendo buscadas. Neste sentido, o uso do *Bacillus thuringiensis*, bactéria entomopatogênica tóxica para diversas ordens de insetos (LACEY et al., 2015), e o mecanismo de interferência mediada por RNA (RNAi) são duas abordagens que merecem destaque por apresentarem maior especificidade e seletividade sobre os insetos alvo (GU; KINIPPLE, 2013), colocando ambas as ferramentas como métodos promissores de controle de formigas cortadeiras.

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria entomopatogênica gram-positiva formadora de cristais proteicos com propriedades inseticidas durante sua fase de esporulação. Dada a sua capacidade de colonizar uma vasta gama de hospedeiros e possuir alto grau de especificidade (DE MAAGD et al., 2000; VALICENTE et al., 2018), o interesse agrônomo acerca de diferentes cepas desta bactéria capazes de afetar pragas específicas tem crescido substancialmente nas últimas décadas.

O método de RNAi foi inicialmente descoberto no nematoide *Caenorhabditis elegans* e posteriormente demonstrado em insetos. É um mecanismo de silenciamento gênico pós transcricional encontrado em eucariontes, em que moléculas dupla



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – UFLA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO**  
**DIRETORIA DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA - DINTEC**

E-mail: dintec@ufla.br

fitas de RNA (do inglês double-stranded RNA - dsRNA) são capazes de induzir a degradação de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) homólogas ao gene alvo (MELO; CONTE, 2004). Devido a necessidade de complementaridade entre a molécula de dsRNA com a sequência de mRNA alvo, essa técnica é altamente específica, não bioacumulável no ambiente, dada a natureza da molécula, e com grande potencial de controle de insetos-praga.

Com base no exposto, espera-se, com o desenvolvimento desta proposta, utilizar estas duas abordagens como métodos alternativos ao uso de inseticidas químicos para o controle de formiga cortadeira, visando produzir moléculas capazes de controlar as populações de formigas no campo e garantir a sustentabilidade do setor florestal através do emprego de estratégias que sejam economicamente viáveis no longo prazo e ambientalmente seguras.

## 7. OBJETIVO GERAL

O objetivo da proposta é desenvolver produtos de base biológica e molecular para substituir os compostos químicos atualmente empregados no setor florestal para controle de formigas cortadeiras, considerados de amplo espectro de ação e potencialmente danosos ao homem e ao meio ambiente. Para alcançar tal finalidade, as abordagens escolhidas envolvem o estudo de cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) eficientes na indução da mortalidade das formigas e identificação de genes candidatos alvo do silenciamento mediado por interferência de RNA (RNAi) através de análises de bioinformática no transcriptoma da espécie *Atta sexdens* (saúva-limão).

## 8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Seleção de genes alvo do RNAi em dados de transcriptoma;
- 2- Síntese de dsRNA para bioensaios de mortalidade;
- 3- Análise da expressão gênica após bioensaios;
- 4- Clonagem e produção de dsRNA em bactérias;
- 5- Bioensaios de mortalidade das formigas com as bactérias produtoras de dsRNA;
- 6- Produção em escala das bactérias contendo dsRNA para bioensaios com colônias;
- 7- Bioensaios de mortalidade com suspensões de Bt;
- 8- Postulado de Koch com as cepas de Bt mais virulentas;
- 9- Sequenciamento das cepas mais virulentas;
- 10- Expressão heteróloga das proteínas causadoras da mortalidade;
- 11- Produção em escala das bactérias contendo proteínas tóxicas para bioensaios com colônias;
- 12- Sequenciamento e identificação de genes letais nas Cepas de bactérias BT24, BT16 e BT06 e sua aplicação no aumento da mortalidade em Formigas Cortadeiras;
- 13- Isolamento, avaliação de mortalidade e sequenciamento de novas cepas de bactérias Bt como estratégia de controle de Formigas Cortadeiras;
- 14- Sequenciamento da microbiota de diferentes fases de desenvolvimento de formigas cortadeiras para desenvolvimento de estratégias de controle;
- 15- Testes de efetividade de campo.

## 9. JUSTIFICATIVA

As formigas cortadeiras estão entre as pragas mais devastadoras de florestas plantadas e os danos causados por esses insetos ultrapassam a casa dos milhões de dólares anualmente. Considerando que os compostos químicos atualmente empregados no controle dessas pragas no campo são capazes de causar toxicidade também ao homem e ao meio ambiente, o desenvolvimento de estratégias alternativas ao uso destes químicos se torna cada vez mais necessário. As bactérias *Bacillus thuringiensis* e o mecanismo de RNA interferente são alternativas biológicas e moleculares, respectivamente, consideradas viáveis para atingir esta finalidade. Devido ao potencial dessas estratégias de afetar determinados insetos-praga especificamente, suas aplicações no controle de insetos-praga já vem sendo descritas por vários trabalhos na literatura. Levando em conta os resultados positivos através do uso dessas abordagens para diferentes



insetos-praga, tal projeto tem como objetivo central produzir moléculas, a partir dessas duas estratégias, que sejam capazes de causar mortalidade das formigas cortadeiras no campo e, conseqüentemente, do seu fungo simbiote, criando produtos que possam atuar como alternativa ao uso dos compostos químicos destinados a sair do mercado em função do amplo espectro de ação no campo, o que afeta organismos não alvo.

## 10. METODOLOGIA / FORMA DE DESENVOLVIMENTO

### 1. Criação e obtenção de amostras biológicas

As amostras biológicas referentes à formiga cortadeira *Atta sexdens* serão coletadas de colônias mantidas em sala de criação com condições de temperatura, luminosidade e umidade controladas no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LMIP), Departamento de Entomologia (DEN), da Universidade Federal de Lavras (UFLA) para uso no desenvolvimento e execução dos experimentos.

### 2. Análises de dados de RNA-Seq

Dada à disponibilidade de dados do sequenciamento de RNA (RNA-Seq) relacionada com o transcriptoma de diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento de *A. sexdens*, a montagem dos reads brutos, sequenciados das bibliotecas individuais, será feita a partir da estratégia com genoma de referência da espécie *Atta cephalotes* ([http://hymenoptera-genome.org/ant\\_genomes/](http://hymenoptera-genome.org/ant_genomes/)).

As sequências obtidas do RNA-Seq (reads) terão sua qualidade avaliada pela ferramenta FastQC (ANDREWS, 2010), com posterior eliminação das sequências de baixa qualidade com softwares específicos.

Os reads processados serão alinhados ao genoma de referência e os transcritos montados para obtenção do transcriptoma global e dos transcritos individuais. As análises de genes diferencialmente expressos serão conduzidas para avaliar o perfil de expressão dos genes alvo nas amostras de RNA-Seq sem replicatas biológicas.

### 3. Seleção de genes candidatos a RNAi

A seleção dos genes alvo será baseada em estratégias estruturadas a partir do conhecimento do comportamento das formigas, da interação com seu fungo simbiote e de rotas metabólicas que possam ser potencialmente afetadas pelo RNA interferente (RNAi) nos bioensaios de exposição das formigas às moléculas dupla-fita de RNA (dsRNA). Serão selecionados, pelo menos, 10 genes alvo candidatos ao silenciamento gênico mediado pelo RNAi.

### 4. Extração de RNA, clonagem gênica e síntese de dsRNA

Após identificação *in silico* dos genes alvo do mecanismo de RNAi, formigas forrageadoras serão maceradas para extração do RNA total, usando kit específico. A quantificação do RNA será feita em espectrofotômetro e a qualidade avaliada em gel de agarose. Os RNAs de boa qualidade serão convertidos em cDNA com kits comerciais.

Primers específicos para amplificar os cDNAs dos genes alvo serão desenhados com o software OligoPerfect Primer Designer (ThermoFischerScientific), e empregados em reações em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar os fragmentos de interesse que serão clonados em vetores plasmidiais. Os vetores recombinados serão usados para transformação de bactérias *E. coli* posteriormente selecionadas com antibióticos específicos. Tais vetores recombinados serão usados como fonte para a síntese de dsRNA. Serão sintetizadas, pelo menos, 10 moléculas de dsRNA direcionadas aos genes alvo candidatos ao silenciamento gênico mediado pelo RNAi para uso nos bioensaios de mortalidade.

### 5. Bioensaios de ingestão de dsRNA e análise de RT-qPCR

Os bioensaios de ingestão de dietas contendo dsRNA serão conduzidos com formigas forrageadoras individualmente. As formigas serão alimentadas com dieta líquida mais o dsRNA específico em diferentes concentrações. O tratamento controle será composto por dieta líquida livre de dsRNA. Após a ingestão da dieta líquida, a formiga será transferida para pote plástico transparente contendo dieta semissólida. As dietas semissólidas serão trocadas diariamente por 10 dias. Ao todo, 20 formigas serão mantidas em conjunto dentro de cada pote plástico e os potes serão mantidos em



B.O.D. com temperatura e umidade relativa controlada, no escuro. A mortalidade será avaliada após 10 dias do início do bioensaio. As 5 moléculas de dsRNA capazes de induzir maior mortalidade na população de formigas, desde que o mínimo de formigas mortas seja de 50 %, serão usadas em novos bioensaios para análise da expressão gênica.

As análises de RT-qPCR com os 5genes alvo selecionados nos bioensaios de RNAi serão feitas no sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR usando o sistema SYBR Green. Os 3 genes alvo que apresentarem redução na expressão  $\geq 30$  % serão utilizados nos experimentos seguintes de clonagem gênica para síntese em larga-escala de dsRNA em bactérias.

#### 6. Clonagem gênica e síntese de dsRNA em *E.coli*

A clonagem gênica dos potenciais genes alvo do RNAi ocorrerá conforme descrito no tópico 2.4., com modificações. Serão usadas enzimas de restrição e de ligação a DNA, assim como o vetor plasmidial específico para clonar os fragmentos de interesse. Os vetores recombinados serão usados para transformação de bactérias *E. coli* deficientes de RNase do tipo III. As colônias bacterianas supostamente transformadas serão confirmadas na presença de antibióticos marcadores de seleção específicos.

A produção de dsRNA será conduzida de acordo com o protocolo de Papic et al. (2018), com modificações. Posteriormente, as bactérias serão mortas por aquecimento e as suspensões bacterianas serão resfriadas a temperatura ambiente para uso nos bioensaios de mortalidade com as formigas cortadeiras.

#### 7. Bioensaio de mortalidade com dsRNA produzidos por bactérias

O bioensaio de mortalidade empregando as bactérias produtoras de dsRNA seguirá a metodologia descrita por Bueno et al. (1997), com modificações. As formigas serão expostas a dietas semissólidas colocadas em placas de Petri de vidro. As dietas serão banhadas com diferentes volumes das suspensões bacterianas produtoras de dsRNA previamente mortas por aquecimento e os tratamentos controle serão compostos por dietas banhadas ou com H<sub>2</sub>O destilada autoclavada ou por bactérias *E. coli* não produtoras de dsRNA.

O fornecimento de suspensões bacterianas sobre as dietas ocorrerá nos 3 dias iniciais de bioensaio. Decorrido este período, as dietas serão renovadas diariamente por mais 12 dias, porém sem adição das suspensões bacterianas, totalizando 15 dias de bioensaio. A contagem das formigas vivas será feita a cada 24 h até o fim do bioensaio e as formigas mortas serão retiradas das placas.

#### 8. Bioensaios com isolados de *Bacillus thuringiensis* (Bt) e Postulado de Koch

Diferentes isolados públicos de Bt serão testados quanto a sua toxicidade contra as formigas cortadeiras *A. sexdens*. Os isolados públicos serão obtidos a partir do banco de estirpes da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Os isolados serão induzidos a produzir as formas esporuladas *in vitro* para serem usadas nos bioensaios de toxicidade.

O bioensaio de mortalidade empregando os isolados de Bt seguirá a metodologia descrita por Bueno et al. (1997) com modificações, similarmente ao descrito no tópico 2.7. Os 5 isolados de Bt mais virulentos, com mortalidade  $\geq 40$  % da população de formigas, serão avaliados pelo Postulado de Koch.

Para a montagem do postulado de Koch, os insetos mortos pelos isolados de Bt serão imersos em solução de hipoclorito de sódio, macerados em solução salina e, posteriormente, plaqueados em meio de cultivo em condições específicas para crescimento de Bt.

Os isolados de Bt serão analisados em microscópio de contraste de fases e aqueles que apresentarem cristais serão selecionados e crescidos em condições de cultivo específicas. O bioensaio de mortalidade com os Bt isolados das formigas mortas serão conduzidos da mesma forma que o bioensaio anterior de mortalidade. Espera-se que seja induzida, pelo menos, 40 % de mortalidade nas populações de formigas a partir dos isolados de Bt. Os 5 isolados mais eficientes serão enviados para sequenciamento e posterior análise de bioinformática.

#### 9. Sequenciamento das cepas de Bt e análises de bioinformática



Os cinco isolados de Bt mais eficientes em causar mortalidade das formigas forrageadoras terão seu DNA extraído e as amostras serão enviadas para sequenciamento.

As amostras de DNA bacteriano serão extraídas de acordo com o protocolo de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987) modificado para microrganismos (WILLIAN; FEIL; COPELAND, 2012). O sequenciamento será realizado pelo método paired-end com cobertura média de 50x por amostra.

Os dados brutos referentes às amostras sequenciadas serão montados e anotados de maneira parecida à descrita no tópico 2.2., porém com modificações específicas para montagem de genomas. Como referência, serão usados genomas de estirpes de *B. thuringiensis* disponíveis nos bancos de dados públicos como o NCBI (National Center for Biotechnology Information), DDBJ (DNA Data Bank of Japan) e BGSC (Bacillus Genetic Stock Center).

Ao menos 3 potenciais genes cry codificadores de proteínas tóxicas contra *A. sexdens* de cada um dos 5 isolados de Bt serão anotados funcionalmente utilizando software específico para a obtenção de uma melhor descrição sobre as características funcionais dessas sequências.

#### 10. Clonagem gênica e expressão heteróloga de proteínas CRY

Após a análise dos dados do sequenciamento dos isolados de Bt mais promissores na indução da mortalidade das formigas cortadeiras, pelo menos 1 gene cry associado com a síntese de proteínas tóxicas de cada um dos 5 isolados de Bt será selecionado para utilização em experimentos de clonagem gênica.

A clonagem gênica dos genes cry previamente selecionados será conduzida de maneira semelhante à descrita no tópico 2.4.

Para os experimentos de expressão heteróloga de proteínas, cepas específicas de *E. coli* serão transformadas com o vetor recombinante abrigando o gene cry de interesse e cultivadas em condições específicas para estimular a produção de proteína. As proteínas CRY purificadas das bactérias serão posteriormente utilizadas em novos bioensaios de mortalidade (similarmente ao descrito no tópico 2.5.) para validação de seu efeito e em testes de colônias.

#### 11. Condições de cultivo do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

O fungo *L. gongylophorus* simbiote das formigas cortadeiras será cultivado por processo fermentativo utilizando meio de cultura conforme descrito por Pagnocca et al. (1990). Fragmentos do fungo simbiote serão inoculados em erlenmeyers contendo meio líquido previamente autoclavado e, em seguida, incubados em condições específicas em escotofase.

#### 12. Sequenciamento do fungo

Com o objetivo de compreender melhor o transcriptoma do fungo *L. gongylophorus*, amostras referentes a diferentes estágios de desenvolvimento serão coletadas para posterior extração de RNA, quantificação e síntese de cDNA, como descrito no tópico 2.5. Este material será enviado para sequenciamento em empresa especializada.

Os reads obtidos do RNA-Seq terão sua qualidade avaliada pela ferramenta FastQC (ANDREWS, 2010), com posterior eliminação das sequências de baixa qualidade com softwares específicos.

Os reads processados serão alinhados ao genoma de referência do fungo *L. gongylophorus* (AYLWARD et al., 2013) e os transcritos montados para obtenção do transcriptoma global e dos transcritos individuais. As análises de genes diferencialmente expressos serão conduzidas para avaliar o perfil de expressão dos genes alvos nas amostras de RNA-Seq.

#### 13. Bioensaios *in vitro* com o fungo e dsRNA

Os bioensaios de mortalidade com o fungo *L. gongylophorus* serão conduzidos com, pelo menos, 10 genes selecionados *in silico* após as análises de bioinformática referentes ao transcriptoma previamente montado do próprio fungo.

O fungo será inoculado em placa de Petri contendo meio de cultura e cultivado em condições específicas por 20 dias. Decorrido este período, discos de micélio serão transferidos para outra placa contendo meio de cultura e 100 µL de dsRNA em diferentes concentrações referentes aos genes alvo previamente selecionados. O tratamento controle será



composto por meio de cultura sem adição de dsRNA. O tamanho dos fungos será medido em intervalos de tempo por um período de 15 dias, visando avaliar a influência das moléculas sobre seu crescimento. As 5 moléculas de dsRNA capazes de provocar as maiores reduções no crescimento do fungo serão usadas nos experimentos de análise da expressão gênica.

As análises de expressão gênica por RT-qPCR serão conduzidas com micélios coletados dos fungos expostos aos meios de cultura contendo dsRNA após as primeiras 48 horas. Os micélios terão seu RNA total extraído e convertido em cDNA para medir o nível de expressão dos genes alvo do mecanismo de RNAi, conforme descrito no tópico 2.5. Os 3 genes alvo que apresentarem redução na expressão  $\geq 30\%$  serão utilizados nos experimentos seguintes.

#### 14. Bioensaio de eficácia de moléculas de dsRNA em subcolônias

Subcolônias de *A. sexdens* com volume de 250 mL serão acondicionadas em bandejas plásticas com dimensões de 30x20 cm onde serão fornecidas diariamente duas folhas de *Acalypha wilkesiana* Muell-Arg (Rosids: Euphorbiaceae) e 10 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura. O dsRNA será entregue via isca confeccionada com polpa cítrica. As subcolônias serão avaliadas diariamente por 42 dias, onde será atribuída uma nota (forrageamento, mortalidade, deterioração e descarte) de acordo com a tabela de avaliação proposta por Barcotto et al. (2016).

#### 15. Bioensaios de eficácia de biopesticida Bt via dieta líquida sobre operárias de *A. sexdens*

Vinte operárias médias de *A. sexdens* serão colocadas em placas de Petri onde será oferecida dieta líquida (BUENO et al., 1997) contendo biopesticidas Bt com concentração de 10<sup>8</sup> esporos/mL provenientes de nove cepas públicas. A mortalidade das operárias será avaliada diariamente. O tratamento controle será feito com dieta líquida pura.

Para a confirmação da mortalidade, será feito o postulado de Koch modificado. Os insetos mortos pelos isolados de Bt serão imersos, em sequência, em solução de hipoclorito de sódio, álcool e água ultrapura e, em seguida, macerados em solução salina para posterior plaqueamento em meio de cultivo em condições específicas para crescimento de Bt.

#### 16. Bioensaios da dinâmica de proteínas CRY nos diferentes estratos do jardim de fungos

Subcolônias das formigas cortadeiras serão acondicionadas em bandejas plásticas e o fungo simbionte em recipiente cilíndrico para formação dos estratos superior, médio e inferior. Serão fornecidos para cada subcolônia 2,0 g de iscas granuladas a base de Bt oriundos de 9 isolados públicos. A partir do segundo dia, as iscas serão substituídas por folhas de *Acalypha wilkesiana* para serem incorporadas no fungo. O tratamento controle será composto por iscas placebo.

As subcolônias serão avaliadas diariamente por 30 dias, atribuindo notas (forrageamento, mortalidade, deterioração e descarte) de acordo com a tabela de avaliação proposta por Barcotto et al. (2016). Todas as subcolônias serão provenientes de colônias adultas mantidas no LMIP (DEN) da UFLA. A cada 5 dias serão coletados fragmentos dos estratos fúngicos para extração de DNA e proteínas, eletroforese de proteínas e teste imunológico visando analisar a integridade das proteínas CRY produzidas pelo Bt distribuídas pelos estratos superior, médio e inferior do fungo. As três proteínas mais eficazes em induzir mortalidade das formigas cortadeiras sem serem degradadas pelos estratos fúngicos serão selecionadas para os testes em colônias de campo.

#### 17. Bioensaio de virulência de iscas contendo o micoparasita *Trichoderma harzianum* associada a imunossupressor

Cápsulas de gelatina de tamanho nº 5 (volume de 0,17 mL) serão preenchidas com *Trichoderma harzianum* (comercial), com o auxílio de uma encapsuladora manual. Em seguida, as cápsulas serão tratadas com o imunossupressor Ciclosporina (comercial) e revestidas por polpa cítrica. Pré-testes já foram realizados para comprovar a eficiência de *Trichoderma* no controle de subcolônias de *A. sexdens* em condições de laboratório.

Porções contendo 2,0 g de cápsulas serão oferecidas simultaneamente para subcolônias de *A. sexdens* com volume de 250 mL acondicionadas em laboratório. As subcolônias serão avaliadas diariamente por 30 dias, atribuindo notas (forrageamento, mortalidade, deterioração e descarte) de acordo com a tabela de avaliação proposta por Barcotto et al. (2016).



18. Sequenciamento e identificação de genes letais nas Cepas de bactérias BT24, BT16 e BT06 e sua aplicação no aumento da mortalidade em Formigas Cortadeiras.

O sequenciamento e identificação dos genes letais presentes nas cepas de bactérias BT24, BT16 e BT06, que têm demonstrado alta eficácia no aumento da mortalidade de larvas de formigas cortadeiras. Por meio da análise genômica dessas cepas, buscaremos identificar os fatores genéticos responsáveis por sua atividade letal, a fim de entender melhor os mecanismos subjacentes a essa ação e explorar seu potencial como estratégias de controle biológico.

19. Isolamento, avaliação de mortalidade e sequenciamento de novas cepas de bactérias Bt como estratégia de controle de Formigas Cortadeiras

O isolamento e a avaliação de novas cepas de bactérias *Bacillus thuringiensis* (Bt) como potenciais agentes de controle biológico de formigas cortadeiras. Serão realizados procedimentos de isolamento, identificação e caracterização das cepas de Bt presentes em diferentes ambientes, seguidos de testes de toxicidade contra larvas e insetos adultos de formigas cortadeiras.

20. Sequenciamento da microbiota de diferentes fases de desenvolvimento de formigas cortadeiras para desenvolvimento de estratégias de controle

O sequenciamento da microbiota presente em diferentes fases de desenvolvimento de formigas cortadeiras, a fim de obter informações detalhadas sobre os microorganismos associados e desenvolver estratégias direcionadas para afetar esses microorganismos, com potenciais impactos nas formigas cortadeiras.

21. Testes em colônia de campo

Todos os produtos selecionados como promissores nos ensaios anteriores serão testados em condições de campo seguindo o protocolo da IN42/2011 do MAPA. Serão selecionados formigueiros ativos de *Atta sexdens* que nunca receberam qualquer tratamento com inseticida. O delineamento estatístico utilizado será o inteiramente casualizado com 10 repetições (ninhos) por tratamento a serem definidos nos ensaios anteriores.

Serão marcados, com estacas, olheiros em cada formigueiro, onde serão aplicados os tratamentos na formulação isca granulada. As avaliações serão realizadas no 1, 3, 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a aplicação. A porcentagem de carregamento e devolução das iscas formicidas será avaliada 24 horas após a aplicação. A atividade de corte e de carregamento de folhas nos olheiros e formigueiros tratados serão avaliados a partir do terceiro dia. Além disso, serão avaliados os seguintes parâmetros: movimentação de terra solta e formigas intoxicadas e mortas, retirada de porções de fungo e aparecimento de fungos oportunistas. Na última avaliação (após 150 dias da aplicação), os formigueiros considerados mortos serão escavados para a certificação de sua mortalidade.

Referências

ANDREWS, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at:

<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

AYLWARD, F. O.; et al. *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 12, p. 3770-3778, 2013.

BARCOTO, M. O. et al. Pathogenic nature of *Syncephalastrum* in *Atta sexdens rubropilosa* fungus gardens. *Pest Management Science*, v. 73, p. 999–1009, 2016.

BUENO, O. C.; et al. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 26, n. 1, p. 107-113, 1997.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, p.11-15, 1987.



PAGNOCCA, F.C. et al. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf cutting ants. Bulletin of Entomological Research, v.80, p.349-352, 1990.

PAPIC, L.; et al. Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant Escherichia coli HT115 in fed-batch culture. Biotechnology Reports, v. 20, e00292, 2018.

WILLIAN, S.; FEIL, H.; COPELAND, A. Bacterial genomic DNA isolation using CTAB. 2012. Available at: <http://1ofdmq2n8tc36m6i46scovo2e.wpengine.netdna-cdn.com/wp-content/uploads/2014/02/JGI-Bacterial-DNA-isolation-CTAB-Protocol-2012.pdf>

**11. RESULTADOS ESPERADOS**

- 1- Identificação de potenciais genes alvo distribuídos pelo transcriptoma para uso nos bioensaios;
- 2- Indução de mortalidade de, ao menos, 50% das formigas expostas às moléculas de dsRNA;
- 3- Seleção dos dsRNAs causadores da mortalidade e diminuição da expressão gênica em, pelo menos, 30%;
- 4- Produção de dsRNA em bactérias após confirmação da presença do plasmídeo contendo o fragmento de interesse dentro das bactérias transformadas;
- 5- Indução de mortalidade nas formigas de, pelo menos, 40% nas formigas cortadeiras expostas as bactérias produtoras de dsRNA;
- 6- Provocar mortalidade das diferentes castas dentro da colônia e, conseqüentemente, do fungo simbiote após experimentos com as bactérias produtoras de dsRNA;
- 7- Indução de mortalidade igual ou superior a 40% nas formigas expostas a dietas contendo Bt;
- 8- Indução de mortalidade igual ou superior a 40% nas formigas expostas aos isolados de Bt após Postulado de Koch;
- 9- Sequenciamento e montagem de genomas das cepas de Bt mais patogênicas às formigas;
- 10- Identificação de potenciais genes codificadores de proteínas tóxicas causadoras da mortalidade nas formigas;
- 11- Produção de proteínas tóxicas às formigas em bactérias hospedeiras através de expressão heteróloga;
- 11- Provocar a mortalidade das diferentes castas dentro da colônia e, conseqüentemente, do fungo simbiote após experimentos com as proteínas tóxicas de Bt purificadas;
- 12- Sequenciamento e identificação de genes letais nas Cepas de bactérias BT24, BT16 e BT06 e sua aplicação no aumento da mortalidade em Formigas Cortadeiras;
- 13- Isolamento, avaliação de mortalidade e sequenciamento de novas cepas de bactérias Bt como estratégia de controle de Formigas Cortadeiras;
- 14- Sequenciamento da microbiota de diferentes fases de desenvolvimento de formigas cortadeiras para desenvolvimento de estratégias de controle;

**III – PRAZO DE EXECUÇÃO DO PROJETO**

**12. PRAZO NECESSÁRIO À EXECUÇÃO DO PROJETO**

**60 meses**

**IV – PARTICIPAÇÃO DE FUNDAÇÃO DE APOIO**

**13. FUNDAÇÃO DE APOIO PARTICIPANTE**

1. Tipo de participação	2. Razão Social
<b>INTERVENIENTE</b>	<b>FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E CULTURAL</b>
3. Endereço da sede (av., rua, nº, bairro)	4. CNPJ/MF





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – UFLA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO**  
**DIRETORIA DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA - DINTEC**

E-mail: dintec@ufla.br

Campus Histórico da UFLA, s/n		07.905.127/0001-07	
5. Cidade/Estado Lavras / MG		6. CEP 37.200-000	7. Telefone (35) 3829-1901
8. Nome do representante legal ANA PAULA PIOVESAN MELCHIORI			9. CPF/MF ***513318**
10. Identidade **2143**	11. Órgão Expedidor SSP/MG	12. Cargo Diretora executiva	13. Data venc. mandato 05/05/2028

#### 14. JUSTIFICATIVA PARA PARTICIPAÇÃO DA FUNDAÇÃO

Destaca-se inicialmente que a Lei 8.958, de 20 de dezembro de 1994, aduz, em seu artigo 1º, que Fundações de Apoio, assim devidamente enquadradas, possuem a finalidade precípua de dar apoio a projetos de ensino, pesquisa e extensão e de desenvolvimento institucional, científico e tecnológico desenvolvidos por ou com Instituições Científicas e Tecnológicas e Instituições Federais de Ensino Superior, inclusive na gestão administrativa e financeira necessária à execução desses projetos.

Isto se justifica, mormente, na medida em que a execução de tais projetos, a despeito de ser uma consequência da determinação contida no artigo 207 da Constituição Federal de 1988, onera setores técnico-administrativos institucionais. Entretanto, o citado ônus, em virtude da própria natureza dos projetos, é transitório, temporalmente limitado. Logo, injustificável e ineficiente – nos termos do artigo 37 também da Constituição – a contratação ou a realocação de servidores.

Sob outro prisma, mas no mesmo sentido, com a expansão da comunidade acadêmica experimentada pela Universidade Federal de Lavras nos últimos anos, houve, indubitavelmente, um significativo aumento nas demandas internas da Instituição. Não por outra razão, a Resolução nº 004, de 2018, do Conselho Universitário da UFLA, em seu artigo 5º, parágrafo 1º, determina a indispensabilidade da interveniência de, pelo menos, uma Fundação de Apoio na celebração de convênios, contratos, termos de outorga e termo de cooperação técnica celebrados com a UFLA.

Válido ressaltar ainda, que as atividades de que trata o presente projeto serão realizadas pela Universidade, sendo atribuído à Fundação somente o apoio à gestão orçamentária e financeira na execução do referido projeto.

Além disso, a intervenção da FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E CULTURAL - FUNDECC, com respaldo na legislação citada, justifica-se, também, uma vez que ela:

1. - encontra-se constituída nos termos da legislação brasileira;
  2. - está incumbida estatutariamente de apoiar as atividades de ensino, pesquisa, extensão e de desenvolvimento institucional da Universidade Federal de Lavras;
  3. - possui inquestionável reputação ético-profissional, não sendo de conhecimento desta Instituição, até presente data, fato que a desabone;
  4. - apoia, de forma significativa, o desenvolvimento das atividades-fim da Universidade, prestando serviços com elevado grau de competência e excelência;
  5. - não possui fins lucrativos;
- nos termos das despesas operacionais previstas no Plano de Trabalho apresentado, oferece preço compatível com os serviços a serem prestados e com a realidade de mercado.

#### V – PLANO DE TRABALHO DO PROJETO

#### 15. EQUIPE TÉCNICA

#### 15.1. INTEGRANTES PRÉ-DEFINIDOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – UFLA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO**  
**DIRETORIA DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA - DINTEC**

E-mail: dintec@ufla.br

Função no Projeto Coordenador	Nome Prof. Ronald Zanetti Bonetti Filho	CPF **282220***
Instituição Universidade Federal de Lavras	Cargo/Função/Discente de: Professor	Regime de trabalho/estudo Dedicação exclusiva
Carga Horária de dedicação ao Projeto (horas semanais) 2 h/semanais	Metas/Etapa/Fase de que participará Todas as fases	
Receberá Bolsa? <input type="checkbox"/> Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não	Tipo de Bolsa (Res. CUNI 004/2018)	Período da Bolsa Valor Mensal da Bolsa -
Função no Projeto Subcoordenador	Nome Prof. Luciano Vilela Paiva	CPF ***.606.356-**
Instituição Universidade Federal de Lavras	Cargo/Função/Discente de: Professor	Regime de trabalho/estudo Dedicação exclusiva
Carga Horária de dedicação ao Projeto (horas semanais) 2 h/semanais	Metas/Etapa/Fase de que participará Todas as fases	
Receberá Bolsa? <input type="checkbox"/> Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não	Tipo de Bolsa (Res. CUNI 004/2018)	Período da Bolsa Valor Mensal da Bolsa -

**15.2. FUNÇÕES DO PROJETO PARA SELEÇÃO DE MEMBROS**

Função	Quantidade	Carga Horária de dedicação	Forma de Remuneração	Valor Mensal [R\$]	Duração (meses)	Metas/Atividades
Bolsista IC	2	20h	Bolsa IC	R\$ 700,00	36	Todas
Bolsista Pos-Doutorado	1	40h	Bolsa Pos-Doc	R\$ 6.000,00	30	Todas

**16. CRONOGRAMA FÍSICO-FINANCEIRO**

Metas	Descrição da Meta	Início	Término	Custo/etapa (R\$)
16.1.	Criação e obtenção de amostras biológicas	1	2	46.000,00
16.2.	Análise de dados de RNA-Seq	2	4	23.000,00
16.3.	Seleção de genes candidatos ao RNAi	4	7	23.000,00
16.4.	Extração de RNA, clonagem gênica e síntese de dsRNA	7	11	23.000,00
16.5.	Bioensaios de ingestão de dsRNA e análise de RT-qPCR	11	14	23.000,00
16.6.	Clonagem gênica e síntese de dsRNA em E. coli	14	17	23.000,00
16.7.	Bioensaio de mortalidade com dsRNA produzidos por bactérias	17	20	23.000,00
16.8.	Bioensaios com isolados de Bacillus thuringiensis (Bt) e Postulado de Koch	20	25	23.000,00
16.9.	Sequenciamento das cepas de Bt e análises de bioinformática	25	29	23.000,00
16.10.	Clonagem gênica e expressão heteróloga de proteínas CRY	29	30	15.000,00
16.11.	Condições de cultivo do fungo simbionte Leucoagaricus gongylophorus	1	6	23.000,00
16.12.	Sequenciamento do fungo	6	12	23.000,00
16.13.	Bioensaios in vitro com o fungo e dsRNA	12	18	23.000,00
16.14.	Bioensaio de eficácia de moléculas de dsRNA em subcolônias	18	22	23.000,00





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – UFPA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO**  
**DIRETORIA DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA - DINTEC**

E-mail: dintec@ufla.br

16.15.	Bioensaios de eficácia de biopesticida Bt via dieta líquida sobre operárias de A. sexdens	22	25	23.000,00
16.16.	Bioensaios da dinâmica de proteínas CRY nos diferentes estratos do jardim de fungos	25	30	23.000,00
16.17.	Bioensaio de virulência de iscas contendo o micoparasita Trichoderma harzianum associada a imunossupressor	30	36	17.000,00
16.18.	Sequenciamento e identificação de genes letais nas Cepas de bactérias BT24, BT16 e BT06 e sua aplicação no aumento da mortalidade em Formigas Cortadeiras;	36	48	44.137,00
16.19.	Isolamento, avaliação de mortalidade e sequenciamento de novas cepas de bactérias Bt como estratégia de controle de Formigas Cortadeiras;	37	48	44.000,00
16.20.	Sequenciamento da microbiota de diferentes fases de desenvolvimento de formigas cortadeiras para desenvolvimento de estratégias de controle;	38	48	44.000,00
16.21.	Teste de mortalidade em Formigas Cortadeiras com proteínas expressas de forma heteróloga a partir dos genes identificados pelo sequenciamento das cepas BT24, BT16 e BT06;	48	60	22.000,00
16.22.	Sequenciamento da microbiota dos intestinos já isolados de formigas cortadeiras e caracterização dos organismos via análises de bioinformática;	48	60	44.000,00
16.23.	Desenvolvimento de um pipeline de bioinformática para a identificação e prospecção de genes de patogenicidade nas cepas isoladas e sequenciadas pelo grupo;	48	60	44.137,00
16.24.	Testes em colônias de laboratório e campo com as cepas isoladas e caracterizadas	48	60	22.000,00
Total				664.274,00

**17. PLANO DE APLICAÇÃO DE RECURSOS**

**17.1. MATERIAL DE CONSUMO**

Especificação	Unidade de Medida	Quantidade	Valores [R\$]	
			Unitário [R\$]	Total [R\$]
Materiais de laboratório (vidrarias e reagentes), campo e escritório dentre outros	Variável	Variável	Variável	62.889,50
Combustível	Variável	Variável	Variável	5.000,00
17.1.1 Subtotal da rubrica [R\$]				<b>67.889,50</b>

**17.2. MATERIAL PERMANENTE**

Especificação	Unidade de Medida	Quantidade	Valores [R\$]	
			Unitário [R\$]	Total [R\$]
Máquina iscas	un	1	29.500,00	29.500,00
Equipamento Servidor de processamento de dados	un	1	80.000,00	80.000,00
17.2.1 Subtotal da rubrica [R\$]				<b>109.500,00</b>

**17.3. SERVIÇOS DE TERCEIROS (PESSOAS FÍSICAS E JURÍDICAS)**

Especificação	Unidade de Medida	Quantidade	Valores [R\$]	
			Unitário [R\$]	Total [R\$]





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – UFLA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO**  
**DIRETORIA DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA - DINTEC**

E-mail: dintec@ufla.br

Manutenção de equipamentos, incluindo peças e matérias para manutenção, dentre outros	un	variável	variável	15.510,00
Análises moleculares, análises proteômicas e metabolômicas	un	variável	variável	58.206,60
Sequenciamentos	un	variável	variável	45.000,00
Locação de veículo	un	variável	variável	14.000,00
Despesas com tarifas bancárias	un	variável	variável	150,00
Passagens aéreas	un	variável	variável	10.000,00
			<b>17.3.1 Subtotal da rubrica [R\$]</b>	<b>142.866,60</b>

#### 17.4. DIÁRIAS E RESSARCIMENTOS DE DESPESAS DE VIAGEM

Especificação	Unidade de Medida	Quantidade	Valores [R\$]	
			Unitário [R\$]	Total [R\$]
Ressarcimento de despesas de viagem (pedágio, combustível, dentre outras despesas durante as viagens)	un	variável	variável	2.000,00
Valor utilizado proveniente aos rendimentos de aplicação financeira (não engloba ao total do projeto)				20.000,00
Diárias (valores de acordo com RN040/2013 do CNPq) para atividade de ensino, pesquisa e extensão, eventos e coleta de campo	un	variável	320,00	22.400,00
			<b>17.4.1 Subtotal da rubrica [R\$]</b>	<b>24.400,00</b>

#### 17.5. BOLSAS

Especificação	Quantidade	Valor unitário [R\$]	Valor mensal [R\$]	Número de meses	Total [R\$]
Bolsa IC	2	700,00	1.400,00	36	50.400,00
Bolsa Pos-Doutorado	1	6.000,00	6.000,00	30	180.000,00
			<b>17.5.1 Subtotal da rubrica [R\$]</b>		<b>230.400,00</b>

**18. CUSTO DA EXECUÇÃO DO PROJETO [R\$] 575.056,10**

#### 19. DESPESAS OPERACIONAIS E ADMINISTRATIVAS DA FUNDAÇÃO DE APOIO

	Administrativo	Financeiro	Jurídico	RH	Projetos	Compras
	<b>R\$ 5.934,58</b>	<b>R\$ 11.046,83</b>	<b>R\$ 5.808,07</b>	<b>R\$ 2.875,28</b>	<b>R\$ 17.412,70</b>	<b>R\$ 14.428,16</b>
Pessoal	R\$ 4.281,45	R\$ 7.969,64	R\$ 4.190,18	R\$ 2.074,35	R\$ 12.562,24	R\$ 10.409,07
Material de consumo/software	R\$ 235,58	R\$ 438,51	R\$ 230,56	R\$ 114,14	R\$ 691,21	R\$ 572,74
Manutenção móvel/imóvel	R\$ 138,85	R\$ 258,47	R\$ 135,89	R\$ 67,27	R\$ 407,41	R\$ 337,58
Assessorias	R\$ 871,50	R\$ 1.622,25	R\$ 852,92	R\$ 422,24	R\$ 2.557,08	R\$ 2.118,80
Tributos/Anuidades/Encargos	R\$ 33,90	R\$ 63,11	R\$ 33,18	R\$ 16,43	R\$ 99,48	R\$ 82,43
Depreciação Patrimonial	R\$ 208,99	R\$ 389,02	R\$ 204,53	R\$ 101,25	R\$ 613,19	R\$ 508,09
Gestão de Projetos	R\$ 164,30	R\$ 305,84	R\$ 160,80	R\$ 79,60	R\$ 482,08	R\$ 399,45
<b>TOTAL</b>	<b>R\$ 5.934,58</b>	<b>R\$ 11.046,83</b>	<b>R\$ 5.808,07</b>	<b>R\$ 2.875,28</b>	<b>R\$ 17.412,70</b>	<b>R\$ 14.428,16</b>
<b>VALOR TOTAL DOA FUNDECC R\$575.505,61 (Cinquenta e sete mil quinhentos e cinco reais e sessenta e um centavos.)</b>						
A DOA SERÁ RETIRADA DE ACORDO COM A ARRECADAÇÃO						

**19.1. CUSTO TOTAL DA DESPESA OPERACIONAL [R\$] 57.505,61**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – UFLA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO**  
**DIRETORIA DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA - DINTEC**  
 E-mail: dintec@ufla.br

<b>20. SUBTOTAL DO PROJETO [R\$]</b>	<b>632.561,71</b>
--------------------------------------	-------------------

<b>21. TAXA DE RESSARCIMENTO À UFLA</b>		
<i>Cálculo de acordo com o Capítulo V e o Anexo II, Tabela 7 da Resolução CUNI nº 04/2018</i>		
Descrição	Percentual	Valor [R\$]
Taxa de Ressarcimento pelo Nome e Imagem (TRNI) relativa ao valor do custo da execução do projeto do instrumento originário (R\$ 348.205,09)	4,87%	16.974,27
Taxa de Ressarcimento pelo Nome e Imagem (TRNI) relativa ao valor do custo da execução do projeto referente ao 1º aditivo (R\$113.648,41)	4,6%	5.227,83
Taxa de Ressarcimento pelo Nome e Imagem (TRNI) relativa ao valor do custo da execução do projeto referente ao 2º aditivo (R\$ 113.648,41)	5%	5.682,12
Taxa de Ressarcimento por Laboratório (TRML) relativa ao valor do custo da execução do 1º aditivo (R\$ 113.648,41)	1,67%	1.896,05
Taxa de Ressarcimento por Laboratório (TRML) relativa ao valor do custo da execução do 2º aditivo (R\$ 113.648,41)	1,7%	1.932,02
<b>21.1. Ressarcimento total devido à UFLA [R\$]:</b>		<b>31.712,29</b>

<b>22. TOTAL DO PROJETO [R\$]</b>	<b>664.274,00</b>
-----------------------------------	-------------------

**VI – CUSTEIO DO PROJETO**

<b>23. FONTE DO CUSTEIO E DESCRIÇÃO DOS RECURSOS</b>		
Fonte	descrição da Receita	Valor [R\$]
<b>Klabin S.A.</b>	Recursos financeiros	<b>664.274,00</b>
<b>UFLA Contrapartida</b>	Capital Intelectual e infraestrutura	<b>743.745,40</b>
	<b>23.1. TOTAL DAS RECEITAS [R\$]</b>	<b>1.408.019,40</b>

**VII – CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO FINANCEIRO**

**24. DESCRIÇÃO DO FINANCIAMENTO DO PROJETO**

<b>24.1. KLABIN</b>			
ETAPA/FASE	Início	Término	Valor (R\$)
16.1.	1	2	46.000,00
16.2.	2	4	23.000,00





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – UFLA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO**  
**DIRETORIA DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA - DINTEC**

E-mail: dintec@ufla.br

16.3.	4	7	23.000,00
16.4.	7	11	23.000,00
16.5.	11	14	23.000,00
16.6.	14	17	23.000,00
16.7.	17	20	23.000,00
16.8.	20	25	23.000,00
16.9.	25	29	23.000,00
16.10.	29	30	15.000,00
16.11.	1	6	23.000,00
16.12.	6	12	23.000,00
16.13.	12	18	23.000,00
16.14.	18	22	23.000,00
16.15.	22	25	23.000,00
16.16.	25	30	23.000,00
16.17.	30	36	17.000,00
16.18.	36	48	44.137,00
16.19	37	48	44.000,00
16.20	38	48	44.000,00
16.21	48	60	22.000,00
16.22	48	60	44.000,00
16.23	48	60	44.137,00
16.24	48	60	22.000,00
<b>24.1.1. TOTAL DO DESEMBOLSO [R\$]</b>			<b>664.274,00</b>

**VIII – BENEFÍCIOS A SEREM OBTIDOS PELA UFLA COM A EXECUÇÃO DO PROJETO**

<b>25. RELAÇÃO DE BENS, MANUTENÇÃO DA ESTRUTURA, BOLSAS PARA DISCENTES ETC</b>					
Tipo	Descrição	Quant.	Valores [R\$]		
			Unit ou Per Capta	Mensal	Total
Capital	Máquina iscas	1	Unidade	-	29.500,00
Capital	Servidor para processamento de dados	1	Unidade	-	80.000,00
Bolsa	Bolsa IC	2	36	700,00	50.400,00
Bolsa	Pos-doutorado	1	30	6.000,00	180.000,00
<b>25.1 VALOR TOTAL DOS BENEFÍCIOS [R\$]</b>					<b>339.900,00</b>

**IX – APROVAÇÃO DO PROJETO**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – UFLA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO**  
**DIRETORIA DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA - DINTEC**

E-mail: dintec@ufla.br

**26. APROVAÇÃO PELO ÓRGÃO COLEGIADO**

Eu, abaixo assinado, na condição de Chefe do Departamento de Entomologia, declaro, para os devidos fins, que o presente Plano de Trabalho foi aprovado pelo Conselho Departamental.

Nome Ronald Zanetti	SIAPE 3183764	Assinatura  Documento assinado digitalmente RONALD ZANETTI BONETTI FILHO Data: 18/12/2024 14:17:02-0300 Verifique em <a href="https://validar.iti.gov.br">https://validar.iti.gov.br</a>
Cargo/Função Chefe do DEN		

**27. APROVAÇÃO PELA FUNDAÇÃO DE APOIO**

Eu, abaixo assinado, na condição de Diretora Executiva da Fundação de Desenvolvimento Científico e Cultural (FUNDECC), declaro, para os devidos fins, que o presente Plano de Trabalho foi aprovado no âmbito desta Fundação. Declaro, ainda, que não serão contratadas empresas das quais participem de alguma forma o Coordenador do Projeto, ou seu cônjuge, companheiro ou parentes em linha reta, colateral ou por afinidade, até o 3º grau.

Nome ANA PAULA PIOVESAN MELCHIORI	Assinatura
--------------------------------------	------------

**28. APROVAÇÃO PELA KLABIN**

Eu, abaixo assinado, na condição de Diretor da Klabin S.A. declaro, para os devidos fins, que o presente Plano de Trabalho foi aprovado no âmbito desta empresa.

Nome	Assinatura
------	------------

**X – DECLARAÇÃO DO COORDENADOR**

**29. DECLARAÇÃO**

Declaro, para os devidos fins de direito, na função de Coordenador do Projeto relacionado ao presente Plano de Trabalho, que cumprirei o disposto neste Projeto e no instrumento jurídico dele derivado e, em especial o disposto na Resolução CUNI nº 004/2018. Declaro ainda, que não possuo cônjuge, companheiro ou parente em linha reta, colateral ou por afinidade, até o 3º grau, não pertencente ao quadro ou do corpo discente da UFLA, como integrante da equipe técnica.

Nome Ronald Zanetti Bonetti Filho	SIAPE 3183764	Assinatura  Documento assinado digitalmente RONALD ZANETTI BONETTI FILHO Data: 18/12/2024 14:15:59-0300 Verifique em <a href="https://validar.iti.gov.br">https://validar.iti.gov.br</a>
Cargo Professor Titular		



## Certificado de Conclusão

Identificação de envelope: 2E61A4D0-954B-41FF-962F-04619BF79451

Status: Concluído

Assunto: DocuSign: Validação de

CONTRATO - UFLA ZCN9150

UNIDADE: Florestal

DIRETORIA:

FLORESTAL

SOLICITANTE: Hosana Bueno Nascimento

DOCUMENTO:

CONTRATO

CÓDIGO DOCUMENTO: 9150

NUMERAÇÃO: 000

FORNECEDOR: UFLA

ILHA: 000

PROJETO:

Envelope fonte:

Documentar páginas: 19

Certificar páginas: 5

Assinatura guiada: Ativado

Selo com Envelopeld (ID do envelope): Ativado

Fuso horário: (UTC-03:00) Brasília

Assinaturas: 3

Rubrica: 130

Selos: 19

Remetente do envelope:

Maiara da Silva Lacerda

Avenida Brigadeiro Faria Lima, nº 3600, 3º,4º e 5º andares

SP, São Paulo 04538-132

maiara.l@klabin.com.br

Endereço IP: 163.116.228.60

## Rastreamento de registros

Status: Original

31/01/2025 09:17:34

Portador: Maiara da Silva Lacerda

maiara.l@klabin.com.br

Local: DocuSign

## Eventos do signatário

Natalia Oliveira

natalia.sousa.tc@fornecedores.klabin.com.br

Nível de segurança: E-mail, Autenticação da conta (Nenhuma)

## Assinatura



Usando endereço IP: 163.116.233.53

## Registro de hora e data

Enviado: 31/01/2025 10:15:59

Visualizado: 31/01/2025 10:30:22

Assinado: 31/01/2025 10:30:50

### Termos de Assinatura e Registro Eletrônico:

Não oferecido através do DocuSign

Hosana Bueno Nascimento

hosana.nascimento@klabin.com.br

Nível de segurança: E-mail, Autenticação da conta (Nenhuma)

*HBN*

Adoção de assinatura: Estilo pré-selecionado

Usando endereço IP: 163.116.233.77

Enviado: 31/01/2025 10:30:55

Visualizado: 31/01/2025 10:35:32

Assinado: 31/01/2025 10:36:19

### Termos de Assinatura e Registro Eletrônico:

Não oferecido através do DocuSign

Mariane Bueno de Camargo

maricamargo@klabin.com.br

Klabin

Nível de segurança: E-mail, Autenticação da conta (Nenhuma)

*MBC*

Adoção de assinatura: Estilo pré-selecionado

Usando endereço IP: 163.116.228.138

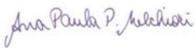
Enviado: 31/01/2025 10:30:56

Visualizado: 31/01/2025 11:03:47

Assinado: 31/01/2025 11:04:14

### Termos de Assinatura e Registro Eletrônico:

Não oferecido através do DocuSign

Eventos do signatário	Assinatura	Registro de hora e data
<p>Fernando Olivo fernando.olivo@klabin.com.br 064.244.009-31 Nível de segurança: E-mail, Autenticação da conta (Nenhuma)</p>	<p>FO</p> <p>Adoção de assinatura: Estilo pré-selecionado Usando endereço IP: 163.116.233.87</p>	<p>Enviado: 31/01/2025 10:30:56 Visualizado: 31/01/2025 13:35:49 Assinado: 31/01/2025 13:36:11</p>
<p><b>Termos de Assinatura e Registro Eletrônico:</b> Aceito: 30/09/2024 10:57:46 ID: 78e83d64-1b28-4132-a3ce-80b95def3b55</p>		
<p>Ronald Zanetti Bonetti Filho zanetti@ufla.br Professor titular Nível de segurança: E-mail, Autenticação da conta (Nenhuma)</p>	 <p>Adoção de assinatura: Desenhado no dispositivo Usando endereço IP: 177.105.15.27</p>	<p>Enviado: 31/01/2025 13:36:18 Visualizado: 31/01/2025 15:56:29 Assinado: 31/01/2025 16:02:45</p>
<p><b>Termos de Assinatura e Registro Eletrônico:</b> Aceito: 31/01/2025 15:56:29 ID: 3a6a9355-b7b1-4cdc-81b3-b56103cdedb7</p>		
<p>Jackson Antonio Barbosa reitoria@ufla.br Vice Reitor UFLA Nível de segurança: E-mail, Autenticação da conta (Nenhuma)</p>	<p>Jackson Antonio Barbosa</p> <p>Adoção de assinatura: Estilo pré-selecionado Usando endereço IP: 177.105.30.23</p>	<p>Enviado: 31/01/2025 13:36:17 Visualizado: 03/02/2025 08:27:03 Assinado: 04/02/2025 14:35:22</p>
<p><b>Termos de Assinatura e Registro Eletrônico:</b> Aceito: 03/02/2025 08:27:03 ID: 03aaad70-07d6-479a-a875-e7f28b9dffb1</p>		
<p>Ana Paula Piovesan Melchiori diretoria@admfundecc.org.br Nível de segurança: E-mail, Autenticação da conta (Nenhuma)</p>	 <p>Adoção de assinatura: Imagem de assinatura carregada Usando endereço IP: 189.89.223.115</p>	<p>Enviado: 31/01/2025 13:36:19 Visualizado: 04/02/2025 16:30:55 Assinado: 04/02/2025 16:48:42</p>
<p><b>Termos de Assinatura e Registro Eletrônico:</b> Aceito: 04/02/2025 16:30:55 ID: 2b1e349c-a607-4c3d-afb5-1736d0c2d67f</p>		
<p>Francisco C Razzolini fcrazzolini@klabin.com.br Diretor Executivo Diretor Executivo Nível de segurança: E-mail, Autenticação da conta (Nenhuma)</p>	<p>Francisco C Razzolini</p> <p>Adoção de assinatura: Estilo pré-selecionado Usando endereço IP: 163.116.233.43</p>	<p>Enviado: 04/02/2025 16:48:51 Visualizado: 04/02/2025 17:11:50 Assinado: 04/02/2025 17:12:43</p>
<p><b>Termos de Assinatura e Registro Eletrônico:</b> Aceito: 04/02/2025 17:11:50 ID: a6ea44ef-a03b-4c2f-94ce-d808d986b14d</p>		

Eventos do signatário presencial	Assinatura	Registro de hora e data
Eventos de entrega do editor	Status	Registro de hora e data
Evento de entrega do agente	Status	Registro de hora e data

Eventos de entrega intermediários	Status	Registro de hora e data
Eventos de entrega certificados	Status	Registro de hora e data
Eventos de cópia	Status	Registro de hora e data
Hosana Bueno Nascimento hosana.nascimento@klabin.com.br Nível de segurança: E-mail, Autenticação da conta (Nenhuma) <b>Termos de Assinatura e Registro Eletrônico:</b> Não oferecido através do DocuSign	<b>Copiado</b>	Enviado: 31/01/2025 10:15:58 Visualizado: 31/01/2025 10:16:32
João Antônio Cruz cpar@ufla.br Nível de segurança: E-mail, Autenticação da conta (Nenhuma) <b>Termos de Assinatura e Registro Eletrônico:</b> Não oferecido através do DocuSign	<b>Copiado</b>	Enviado: 31/01/2025 13:36:18 Visualizado: 31/01/2025 13:57:51
Roberta Azambuja de Sousa roberta.sousa@klabin.com.br Nível de segurança: E-mail, Autenticação da conta (Nenhuma) <b>Termos de Assinatura e Registro Eletrônico:</b> Não oferecido através do DocuSign	<b>Copiado</b>	Enviado: 04/02/2025 16:48:51
Eventos com testemunhas	Assinatura	Registro de hora e data
Eventos do tabelião	Assinatura	Registro de hora e data
Eventos de resumo do envelope	Status	Carimbo de data/hora
Envelope enviado	Com hash/criptografado	31/01/2025 10:15:59
Entrega certificada	Segurança verificada	04/02/2025 17:11:50
Assinatura concluída	Segurança verificada	04/02/2025 17:12:43
Concluído	Segurança verificada	04/02/2025 17:12:43
Eventos de pagamento	Status	Carimbo de data/hora
<b>Termos de Assinatura e Registro Eletrônico</b>		

## **ELECTRONIC RECORD AND SIGNATURE DISCLOSURE**

From time to time, Klabin S.A. (we, us or Company) may be required by law to provide to you certain written notices or disclosures. Described below are the terms and conditions for providing to you such notices and disclosures electronically through the DocuSign system. Please read the information below carefully and thoroughly, and if you can access this information electronically to your satisfaction and agree to this Electronic Record and Signature Disclosure (ERSD), please confirm your agreement by selecting the check-box next to 'I agree to use electronic records and signatures' before clicking 'CONTINUE' within the DocuSign system.

### **Getting paper copies**

At any time, you may request from us a paper copy of any record provided or made available electronically to you by us. You will have the ability to download and print documents we send to you through the DocuSign system during and immediately after the signing session and, if you elect to create a DocuSign account, you may access the documents for a limited period of time (usually 30 days) after such documents are first sent to you. After such time, you may request delivery of such paper copies from us by following the procedure described below.

### **Withdrawing your consent**

If you decide to receive notices and disclosures from us electronically, you may at any time change your mind and tell us that thereafter you want to receive required notices and disclosures only in paper format. How you must inform us of your decision to receive future notices and disclosure in paper format and withdraw your consent to receive notices and disclosures electronically is described below.

### **How to contact Klabin S.A.:**

You may contact us to let us know of your changes as to how we may contact you electronically, to request paper copies of certain information from us, and to withdraw your prior consent to receive notices and disclosures electronically as follows:  
centdoc@klabin.com.br or cdocprojetos@klabin.com.br

### **To advise Klabin S.A. of your new email address**

To let us know of a change in your email address where we should send notices and disclosures electronically to you, you must send an email message to the Technical/Commercial Managers and in the body of such request, you must indicate: your previous email address, your new email address.

If you created a DocuSign account, you may update it with your new email address through your account preferences.

### **To request paper copies from Klabin S.A.**

To request delivery from us of paper copies of the notices and disclosures previously provided by us to you electronically, you must send us an email to [centdoc@klabin.com.br](mailto:centdoc@klabin.com.br) or [cdocprojetos@klabin.com.br](mailto:cdocprojetos@klabin.com.br) and in the body of such request you must state your email address, full name, mailing address, and telephone number.

### **Required hardware and software**

**The minimum system requirements for using the DocuSign system may change over time. The current system requirements are found here:**

**<https://support.docusign.com/guides/signer-guide-signing-system-requirements>.**

### **Acknowledging your access and consent to receive and sign documents electronically**

**To confirm to us that you can access this information electronically, which will be similar to other electronic notices and disclosures that we will provide to you, please confirm that you have read this ERSD, and (i) that you are able to print on paper or electronically save this ERSD for your future reference and access; or (ii) that you are able to email this ERSD to an email address where you will be able to print on paper or save it for your future reference and access. Further, if you consent to receiving notices and disclosures exclusively in electronic format as described herein, then select the check-box next to ‘I agree to use electronic records and signatures’ before clicking ‘CONTINUE’ within the DocuSign system.**

**By selecting the check-box next to ‘I agree to use electronic records and signatures’, you confirm that:**

- **You can access and read this Electronic Record and Signature Disclosure; and**
- **You can print on paper this Electronic Record and Signature Disclosure, or save or send this Electronic Record and Disclosure to a location where you can print it, for future reference and access; and**
- **Until or unless you notify Klabin S.A. as described above, you consent to receive exclusively through electronic means all notices, disclosures, authorizations, acknowledgements, and other documents that are required to be provided or made available to you by Klabin S.A. during the course of your relationship with Klabin S.A..**