



**MARIANA CRISTINA MOI**

**USO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA PARA O  
CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletorichum gloeosporioides* DE CAFÉ  
E APLICAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS ALCOÓLICOS EM SUA  
POTENCIAL INIBIÇÃO.**

**INCONFIDENTES – MG  
2017**

**MARIANA CRISTINA MOI**

**USO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA PARA O  
CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum gloeosporioides* DE CAFÉ  
E APLICAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS ALCOÓLICOS EM SUA  
POTENCIAL INIBIÇÃO.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito de conclusão do curso de Bacharelado em Engenharia Agrônômica no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – *Campus Inconfidentes* para fim de obter o título de Engenheira Agrônoma.

**Orientador:** M.Sc Taciano Benedito Fernandes

**INCONFIDENTES – MG  
2017**

**MARIANA CRISTINA MOI**

**USO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA PARA O  
CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum gloeosporioides* DE CAFÉ  
E APLICAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS ALCOÓLICOS EM SUA  
POTENCIAL INIBIÇÃO.**

Data de aprovação: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

---

**Orientador: M.Sc. Taciano Benedito Fernandes  
IFSULDEMINAS – *Campus Inconfidentes***

---

**Membro: M.Sc. Eduardo de Oliveira Rodrigues  
IFSULDEMINAS – *Campus Inconfidentes***

---

**Membro: D.Sc Ana Cristina F. M. da Silva  
IFSULDEMINAS – *Campus Inconfidentes***

## DEDICATÓRIA

*Dedico a Ilda Amaro Bueno, minha avó, que sempre me encorajou a seguir meus sonhos, depositou em mim toda a sua fé e carinho para que eu seguisse sem fraquejar por todos estes anos em busca dos meus objetivos profissionais.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Adilson Orlando Moi e Jaqueline Ap. Bueno Moi, que não mediram esforços para que eu concluísse a graduação da melhor maneira possível, tornando-se dois verdadeiros pilares da minha vida.

Agradeço aos meus irmãos, Matheus Eduardo Moi e Murilo Moi, pela paciência e ajuda no dia a dia.

Agradeço a Nathalia de Santis Castro Lima pelo companheirismo e dedicação de todos os dias, principalmente naqueles momentos mais difíceis, onde se fez presente ao meu lado, com muito amor, carinho e compreensão.

Agradeço aos meus avós paternos, Orlando Moi e Zilda Michelotto Moi (*in memoria*), apaixonados pela terra e pelo campo, alimentando o sonho da Engenharia Agrônômica dentro de mim desde a minha infância.

Agradeço ao meu orientador e amigo, Taciano Benedito Fernandes, por todos os ensinamentos, a paciência, a ajuda e principalmente, por acreditar em mim.

Agradeço a todos os meus amigos de Leme SP que entenderam a minha ausência em muitos eventos da turma.

Agradeço aos grandes amigos que Inconfidentes-MG me deu, principalmente ao Bruno Junqueira Miranda Ribeiro e Fabiana Cristina Moura Figueiredo que foram verdadeiros amigos durante esse período, parceiros e confidentes que levarei para a vida.

Agradeço as repúblicas “Tocados” e “Mata-Burro” que me acolheram com todo carinho do mundo durante esse ultimo semestre, aos moradores amigos José Ângelo, Thuã Dionísio, Lucas Paiva, Andrew, Felipe Fernandes e Caio Pereira.

Agradeço a todos os professores, que de alguma forma, contribuíram para o meu desenvolvimento, crescimento e formação até aqui.

Agradeço aos funcionários da instituição IFSULDEMINAS- Campus Inconfidentes MG.

## **EPIGRAFE**

*“Tu poderás apenas tornar-se verdadeiramente realizada em algo que amas. Não faças do dinheiro o teu objetivo. Ao invés, busque as coisas que gostas de fazer e faça-as tão bem, que as pessoas não consigam tirar os olhos de ti.”*

Maya Angelou

## RESUMO

O Brasil é o líder mundial na produção e ocupa a segunda colocação no ranking consumidor de bebida, gerando em torno de 5 milhões de empregos diretos ou indiretos ao setor cafeeiro. A qualidade dos grãos de café está diretamente relacionada com o preço final do produto, necessitando assim de cuidados minuciosos durante a colheita e controle adequado contra pragas e doenças. Um parasitóide de relevante importância na agricultura, porém, pouco estudado no café, é o *Colletotrichum gloeosporioides*. Seu controle é basicamente feito através de agrotóxicos, assim, pode-se encontrar vestígios dos resíduos tóxicos nos frutos e no meio ambiente. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de identificar diferentes meios de cultura para o crescimento micelial e aplicação de extratos vegetais alcoólicos alternativos para potencial inibição de *C. gloeosporioides*. Fez-se o uso de espécies vegetais *in natura* de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), arruda (*Ruta graveolens*), citronela (*Cymbopogon nardus*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Para o cultivo de *C. gloeosporioides* utilizou-se os seguintes meios de cultura: Batata Glicose Ágar, Ágar Sabouraud 4%, Ágar Sabouraud Dextrose e Ágar Nutriente acrescidos, correspondentemente, de 1 ml de cada extrato vegetal alcóolico. Todos os meios de cultura utilizados favoreceram o crescimento do fungo estudado. Os quatro extratos vegetais apresentaram potencial inibição no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*.

**Palavras-chave:** *Coffea*; antracnose; plantas medicinais; antifúngico.

## ABSTRACT

Brazil is the leading coffee producer in the world and ranks second in the beverage consumer ranking, generating around 5 million direct or indirect jobs in the coffee sector. The quality of the coffee beans is directly related to the final price of the product, thus requiring thorough care during harvesting and adequate control against pests and diseases. A parasitoid of great importance in agriculture, but little studied in coffee, is *Colletotrichum gloeosporioides*. Its control is basically done through agrochemicals, thus, traces of the toxic residues in the fruits and in the environment can be found. The present work was carried out with the objective of identifying different culture media for mycelial growth and application of alternative alcoholic plant extracts for potential inhibition of *C. gloeosporioides*. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*), ruda (*Ruta graveolens*), citronella (*Cymbopogon nardus*) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) were used in plant species. For the cultivation of *C. gloeosporioides* the following culture media were used: Agar Glucose Potato, Sabouraud Agar 4%, Sabouraud Agar Dextrose and Nutrient Agar, plus 1 ml of each alcoholic extract. All culture media favored the growth of the fungus studied. The four plant extracts presented potential inhibition in the mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides*.

**Keywords:** *Coffea*; Anthracnose; medicinal plants; antifungal.



## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....  | <b>x</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....                                      | <b>3</b>  |
| 2.1. CULTURA CAFEEIRA BRASILEIRA .....                                   | 3         |
| 2.2. RESPONSABILIDADE SOCIOECONÔMICA DO CAFÉ NO BRASIL .....             | 3         |
| 2.3. <i>COLLETOTRICHUM</i> NO CAFEEIRO .....                             | 4         |
| 2.4. IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS .....                            | 5         |
| 2.5. EXTRATOS VEGETAIS NA AGRICULTURA .....                              | 5         |
| 2.6. UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA .....                     | 6         |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                       | <b>7</b>  |
| 3.1. LOCAL DO EXPERIMENTO .....  | 7         |
| 3.2. FUNGO UTILIZADO .....   | 7         |
| 3.3. EXPERIMENTO I: ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS<br>ALCÓOLICOS ..... | 7         |
| 3.4. EXPERIMENTO II: CULTIVO DE <i>C. gloeosporioides</i> .....          | 8         |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                                   | <b>11</b> |
| 4.1. TESTE COM OS EXTRATOS VEGETAIS ALCÓOLICOS .....                     | 11        |
| 4.2. TESTES COM OS MEIOS DE CULTURA .....                                | 14        |
| <b>5. CONCLUSÃO</b> .....  | <b>17</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                  | <b>18</b> |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1:</b> Extratos vegetais alcóolicos de alecrim, arruda, eucalipto e citronela. (Fonte: elaboração própria). .....  | <b>8</b>  |
| <b>Figura 2:</b> Placas com os extratos vegetais alcóolicos e álcool. (Fonte: elaboração própria). A= Extrato alcóolico de eucalipto. B= Extrato alcóolico de alecrim. C= Extrato alcóolico de arruda. D= Extrato alcóolico de citronela. E= Álcool (controle). (Fonte: elaboração própria). ..... | <b>10</b> |
| <b>Figura 3:</b> Amostras abertas dos experimentos realizados em meio de cultura Ágar Nutriente (AN). (Fonte: elaboração própria). .....   | <b>11</b> |
| <b>Figura 4:</b> Amostras abertas dos experimentos realizados em meio de cultura Ágar Sabouraud 4 % (AS4%). (Fonte: elaboração própria). .....   | <b>12</b> |
| <b>Figura 5:</b> Amostras abertas dos experimentos realizados em meio de cultura Batata Glicose Ágar (PGA). (Fonte: elaboração própria). .....   | <b>13</b> |
| <b>Figura 6:</b> Amostras abertas dos experimentos realizados em meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (SDA). (Fonte: elaboração própria). .....   | <b>13</b> |
| <b>Figura 7:</b> Crescimento micelial de <i>C. gloesporioides</i> em AN. (Fonte: elaboração própria)...  | <b>15</b> |
| <b>Figura 8:</b> Crescimento micelial de <i>C. gloesporioides</i> em AS4%. (Fonte: elaboração própria). .....  | <b>15</b> |
| <b>Figura 9:</b> Crescimento micelial de <i>C. gloesporioides</i> PGA. (Fonte: elaboração própria). .....  | <b>15</b> |
| <b>Figura 10:</b> Crescimento micelial de <i>C. gloesporioides</i> em SDA. (Fonte: elaboração própria). .....  | <b>16</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

No cenário mundial, o café é um dos produtos comerciais mais valiosos, ficando atrás somente da matéria bruta do petróleo. A importância econômica de seus grãos é indiscutível, além de beneficiar milhões de pessoas por todo o mundo. Só no Brasil, a cafeicultura proporciona cerca de 5 milhões de empregos em decorrência do processo de cultivo, colheita e beneficiamento, até as etapas de transporte e comercialização. (SINDICAFÉ, 2009)

O Brasil é o maior produtor de café do mundo, correspondendo a um terço da produção total, uma supremacia que detém há mais de 150 anos. Em se tratando de consumo da bebida, possui a segunda colocação. Os principais estados produtores estão localizados na região sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo) com expansão considerável para outras regiões, como norte (Rondônia), nordeste (Bahia) e sul (Paraná). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), em 2016 a produtividade média brasileira foi de 25,5 sacas/ha, representando um aumento de 9sacas/ha desde 2012. A cafeicultura brasileira é conduzida sobre leis trabalhistas e ambientais severas, fundamentando assim, algumas garantias sociais e sustentáveis na produção de café do país.

No intuito de alcançar maior produção de grãos e bebida de qualidade, o produtor enfrenta um grande desafio a frente: a suscetibilidade do café a doenças. No viveiro ou no campo, durante todo o seu ciclo, destacam-se os fungos como agente causal de maior importância e agressividade para o cafezal. Na ausência de monitoramento e práticas de controle no cafezal, o patógeno torna-se responsável pela redução de produção, através lesões e outras deformidades que podem acarretar a morte da planta. (FÁTIMA, 2009)

As doenças fúngicas mais infecciosas do cafeeiro são: Cercosporiose, Ferrugem, Antracnose, Mancha-Manteigosa, Mancha de Phoma, Mancha Americana, Seca dos Ponteiros, entre outras. O gênero *Colletotrichum* pode causar a uma série de doenças emergentes, como a Antracnose

(*C. gloeosporioides*) e Mancha-manteigosa (*C. acutatum*). Parasitoide de relevante importância na agricultura, porém, pouco estudado no café, se tratando de uma doença de âmbito secundário. Os sintomas observados no café são semelhantes aos de Antracnose em outras espécies frutíferas contaminadas, diferenciando-se em pequenos aspectos, contudo, em todas elas se relatou fundamentalmente a presença das manchas escuras e necróticas, peculiaridade dessa doença. (REVISTA CULTIVAR GRANDES CULTURAS, 2014)

Para minimizar os danos causados por essa doença, o controle é feito, basicamente, através de fungicidas químicos registrados. Embora os produtos comerciais se mostrem eficazes, ainda não são totalmente degradados após a aplicação, com isso, podemos encontrar vestígios de agrotóxicos nas plantas, nos frutos e no meio ambiente local. Outra preocupação alarmante é sobre a utilização excessiva de agrotóxicos, que ao serem aplicados de maneira desordenada, contribui para o surgimento de espécies de fungos resistentes e a morte de inimigos naturais, insetos e, contudo a microbiologia do solo. Desagradando relevante porcentual de compradores que, nos dias atuais, se mostram exigentes sobre a qualidade e procedência dos alimentos consumidos e, cada vez mais interessados em produtos orgânicos. (VIANA et al., 1998)

No Brasil, há imensa variedade de espécies de plantas medicinais, muitas delas já utilizadas no controle de fungos, bactérias, vírus, nematoides, entre outros. Pesquisas com extratos vegetais têm sido amplamente difundidos em universidades, empresas e órgãos governamentais, aumentando ainda mais as chances de encontrar substância(s) de potencial fúngico, que no futuro, seriam base na criação de novos fungicidas. (CELOTO et al., 2008)

Em muitos estudos, observou-se que o crescimento de fungos feitos em laboratório, principalmente do gênero *Colletotrichum*, são provindos de meio à base de batata-dextrose-ágar (BDA).

Portanto, o presente trabalho objetivou desenvolver quatro extratos vegetais alcóolicos, utilização de diferentes meios de cultura para o crescimento e desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e, também a aplicação de extratos vegetais alcóolicos no controle e inibição de *Colletotrichum gloeosporioides*.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. CULTURA CAFEIEIRA BRASILEIRA**

Surgiu em 1727, em Belém, trazido pelo sargento Francisco de Melo Palheta da Guiana Francesa. Devido às condições favoráveis encontradas, o café foi passado para outras regiões como Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, Paraná e Minas Gerais e São Paulo. No século XIX, tornou-se pilar da economia brasileira, um dos principais responsáveis pelos investimentos e infraestrutura obtidos nessa época. (TEIXEIRA, 2008)

Com a abolição da escravidão, houve elevação nos custos de mão de obra para os grandes produtores de café, em busca de novos trabalhadores, o Brasil começou a receber inúmeros imigrantes provindos da Europa, sobretudo de italianos. (RODRIGUES et al, 2015)

As produções cafeeiras foram responsáveis por tornar o estado de São Paulo o mais rico do país. Esse período foi tão marcante para a política que foi nomeado de “República do Café com Leite” em menção à alternância de poder entre os presidentes de São Paulo e Minas Gerais, maiores produtores respectivamente. Teve fim em 1930 com o golpe de Estado. (RODRIGUES et al, 2015)

### **2.2. RESPONSABILIDADE SOCIOECONÔMICA DO CAFÉ NO BRASIL**

O Brasil é o líder na produção de café mundial e ocupa a segunda colocação no ranking consumidor de bebida, atrás dos Estados Unidos. Sua liderança de produção não é por acaso, o país é responsável por 30% de todo o mercado cafeeiro internacional, porcentagem equivalente à soma da produção dos outros seis maiores produtores seguintes da lista. (ABIC)

Segundo levantamentos de 2016 feitos pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), haverá um ganho de produtividade de 10,4% a 16,8% em comparação à safra

anterior, estimando assim, uma média de 25,55 sacas por hectare. Esse crescimento na produção de café arábica na maioria dos estados brasileiros, está diretamente associado as condições climáticas adequadas, acompanhada do ciclo de bienalidade positiva.

Conforme BOLETIM SENSORIAL DO AGRONEGÓCIO DE RECIFE, BSAR, (2011) os consumidores de café estão cada dia mais exigentes, interessados em grãos e qualidade de bebida impecáveis, refinando ainda mais seu paladar com o passar do tempo. No Brasil, muitos produtores buscam atender esse público gourmet através de certificação, onde se explora, basicamente, a qualidade, sustentabilidade e tradição.

A evolução da cafeicultura brasileira demonstra a importância dos trabalhos de pesquisas, concentradas nas áreas de melhoramento genético, biotecnologia, segurança alimentar, otimização do sistema produtivo, manejo integrado de pragas e doenças, cafeicultura irrigada, zoneamento climático, colheita e pós-colheita, aperfeiçoamento de processos e desenvolvimento de equipamentos. (MAPA, 2016)

### **2.3. *Colletotrichum* NO CAFEEIRO**

As espécies de fungos responsáveis por doenças no café destacam-se antracnose (*C. gloeosporioides*), mancha-manteigosa (*C. acutatum*) e “Coffee Berry Disease” (*C. kahawae*). A doença CBD ainda não há relatos de seu aparecimento no Brasil, por outro lado, no continente africano seus danos afetam até 80% da produção. Alguns pesquisadores acreditam que a utilização indiscriminada de fungicidas cúpricos no cafeeiro, por longo período, afim de controlar a ferrugem, teria contribuído para uma mutação genética da espécie *C. gloeosporioides* e originado a espécie *C. kahawae*. (SILVA et al, 2004)

Seu aparecimento cada vez mais frequente pode ser observado em regiões produtoras por todos os estados brasileiros e também, pelo mundo. A maioria das espécies de cafeeiro utilizadas no Brasil são suscetíveis à antracnose, principalmente *Coffea arabica* e *C. canephora*. As perdas mais significativas acontecem durante o crescimento vegetativo, mas podem ser observadas durante todo o ciclo da planta, devido a diversas disfunções fisiológicas e fotossintética. (SILVA et al., 2014)

O patógeno *C. gloeosporioides* possui característica de quiescência, mantendo-se em estado de enuncia por tempo indeterminado, geralmente fixado em tecido vegetal infectado,

permanece nessa condição oportunista até o momento favorável de desenvolvimento do fruto (RAMOS et. al., 2016).

#### **2.4. IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS**

As plantas medicinais são culturalmente usadas há muito tempo, desde os primeiros indícios de civilização, provinda de uma fusão entre as tradições dos povos europeus, africanos e indígenas. Recurso esse, praticamente único contra doenças, males e, ou qualquer enfermidade que apareciam entre as pessoas. (FIRMO, MIRANDA, OLEA, 2016). Atualmente, essas plantas ainda são bastante utilizadas, além de demonstrarem benefícios específicos, são facilmente encontradas.

Contudo, ainda há muitas plantas a serem descobertas, baseando se na vasta biodiversidade do Brasil, fazendo-se necessário o investimento em pesquisas destinadas a descobrir espécimes vegetais com características metabólitos surpreendentes para inúmeras funções biológicas, especialmente contra bactérias, vírus e fungos de alta incidência. (SILVA, 2004)

De acordo com Bakkali et al. (2008), os óleos essenciais são compostos complexos, naturais, voláteis, caracterizados por um forte odor e podem ser sintetizados por toda a parte da planta, desempenhando ações como antibacterianos, antivirais, antifúngicos e inseticidas.

#### **2.5. EXTRATOS VEGETAIS NA AGRICULTURA**

Um dos maiores problemas encontrados para a agricultura, ainda é, a utilização indevida e, ou elevada de agrotóxicos. Esse uso indiscriminado tem acarretado diversos problemas ambientais e de saúde pública. Além de aumentar a resistência de patógenos e pragas aos agrotóxicos convencionais, destruir microbiologia do solo, promovendo desequilíbrio ambiental (BETTIOL e MORANDI, 2009).

As plantas e seus extratos estão presentes por toda parte, inclusive em produtos lácteos, farmacêuticos, cosméticos, corantes e entre outros (PELEGRINI e CRUZ, 2012). Extratos são preparações concentradas de diversas consistências possíveis obtidas a partir de matérias-primas vegetais secas, que passaram ou não por tratamento prévio e preparadas por processos envolvendo um solvente (BARBOSA, 2005).

A literatura tem registrado a eficiência de extratos vegetais, obtidos de uma gama enorme de espécies botânicas, na inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica. Dentre os extratos mais pesquisados encontra-se aquele obtido de alho (*Allium sativum* L.). Além do alho, extratos originários de hortelã (*Mentha piperita*) e pimenta (*Capsicum spp.*) também tem evidenciado propriedades antifúngicas, demonstrando potencial de controle para patógenos de plantas. Extratos obtidos de plantas de mamona (*Ricinus communis*) têm sido relatados como inibidores de fungos associados a substratos de formigueiros onde a eliminação destes fungos está relacionada ao controle das formigas. Extratos de outras plantas têm sido testados, dentre elas: *Tominho*, *Tetradenia*, *Rosmarinus*, *Zingiber*, *Ocimum*, *Artemísia*, *Achillea*, *Baccharis*, *Ruta laurus* e *Eucaliptus* (CRUZ et al., 1996).

A partir de estudos realizados, os princípios ativos vegetais serão importante ferramenta sustentável ao combate de pragas e doenças na agricultura. (VENTUROSOSO, 2009). A indústria alimentícia, sob o impulso da geração saúde, começou a procurar esses ingredientes saudáveis e com o apoio dos departamentos de marketing valorizou a atividade dos mesmos.

## **2.6. UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA**

A fim de estudar sobre os microrganismos, é ideal que se cultive esses organismos *in vitro*, buscando-se então, obter um ambiente similar encontrado por ele *in natura*. Há inúmeras maneiras de incitar o desenvolvimento de vírus, bactérias, fungos e protozoários. Os meios de cultura são soluções que apresentam substâncias e condições necessárias ao crescimento microbiano. Existem muitas variedades de meios de cultura, o produto mais eficiente dependerá das características exigidas pelo indivíduo estudado, basicamente contendo água e nutrientes. É importante saber a finalidade de cada meio de cultura, adequando-se ao microrganismo para desenvolvimento desejado (FERREIRA et al., 2009).

Pode-se encontrar meios de cultura em estado sólido, semi-sólido e líquido. Os experimentos em laboratório se tornaram mais fáceis, a partir da utilização de meios de cultura prontos e desidratados, sendo necessário apenas seguir as orientações básicas do fabricante, que inclui pesagem, diluição e esterilização. Atualmente, o meio mais empregado para crescimento de fungos é o BDA (Batata, Dextrose, Ágar), também recomendado para enumeração de leveduras e bolores em alimentos (FERREIRA et al., 2009).



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Local do Experimento**

Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia do IFSULDEMINAS – *Campus* Inconfidentes, no município de Inconfidentes – MG.

#### **3.2. Fungo utilizado**

Os fungos foram obtidos, através da doação de cepas de *C. gloeosporioides* de café da cidade de Muzambinho, MG, do laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

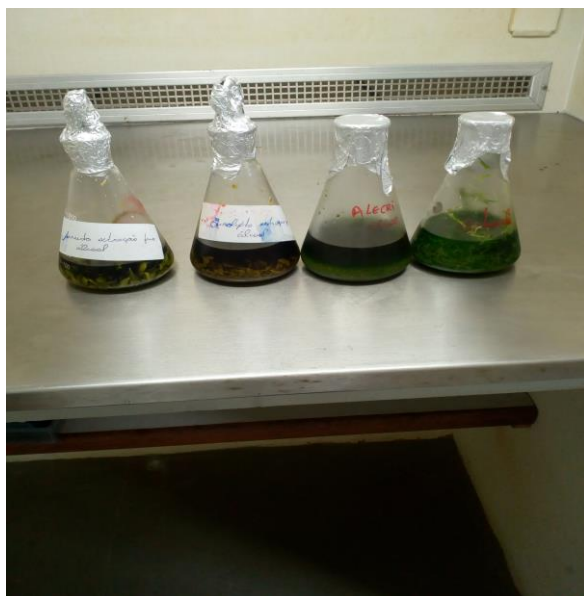
#### **3.3. Experimento I: Elaboração dos extratos vegetais alcóolicos**

Fez-se o uso de espécies vegetais *in natura* de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), arruda (*Ruta graveolens*), citronela (*Cymbopogon nardus*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*). A citronela e eucalipto foram colhidos na horta da fazenda-escola do IFSULDEMINAS - *Campus* Inconfidentes, MG e a arruda e o alecrim foram doados por dois moradores da cidade de Inconfidentes, MG.

O material foi encaminhado ao laboratório de Microbiologia, selecionou-se apenas as folhas das espécies, desprezando assim, hastes e galhos. Com o auxílio de balança de precisão, separou-se 20 g de cada planta para 100 ml de álcool 99%.

As folhas de cada planta, separadamente, após pesagem, foram acondicionadas em *becker* com capacidade para 1 L onde foram acrescidos 500 ml de água de torneira e 10 ml de água sanitária, onde permaneceram por, aproximadamente 3 minutos. Logo em seguida foram lavadas com água destilada por três vezes para a retirada de resíduos de cloro e aguardou-se um período de 24 horas para a volatilização do de resíduos de cloro, seguindo metodologia própria de sanitização.

No intuito de aumentar a disponibilização dos extratos nas placas, cada planta foi liquidificada com 100 ml de álcool 99% em liquidificador doméstico, higienizado com álcool 70% e acondicionadas em *erlenmeyer* com capacidade para 250 ml, encaminhados para mesa agitadora onde permaneceram sob agitação constante por 24 horas a 50 RPM, Figura 1.



**Figura 1:** Extratos vegetais alcóolicos de alecrim, arruda, eucalipto e citronela. (Fonte: elaboração própria).

Para controle e avaliação de possíveis contaminações externas e/ou potencial influência do álcool, foram preparadas placas apenas com 1 ml de álcool 99% para cada meio de cultura, sem o acréscimo dos extratos vegetais.

### **3.4. Experimento II: Cultivo de *C. gloeosporioides***

Para o cultivo de *C. gloeosporioides*, utilizou-se os seguintes meios de cultura: Batata Glicose Ágar, Ágar Sabouraud 4%, Ágar Sabouraud Dextrose e Ágar Nutriente.

Os meios de cultura foram preparados em triplicata e seguindo as recomendações dos fabricantes na rotulação de cada meio de cultura. Após o preparo das soluções, foram acrescidos 1 ml de cada extrato alcóolico para uma placa de Petri correspondente a cada meio de cultura, Tabela 1, logo em seguida as placas foram movimentadas em formato de oito até completa homogeneização dos extratos com os meios de cultura, isoladamente.

**Tabela 1:** Distribuição dos extratos de acordo com os diferentes meios de cultura. Inconfidentes, MG.

| Meios de cultura                 | Extratos Alcólicos |                   |                    |                    |
|----------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
|                                  | EAAr<br>(arruda)   | EAAI<br>(alecrim) | EAC<br>(citronela) | EAE<br>(eucalipto) |
| Ágar Sabouraud 4 % (AS)          | EAAr+AS            | EAAI+AS           | EAC+AS             | EAE+AS             |
| Ágar Nutriente (AN)              | EAAr+AN            | EAAI+AN           | EAC+AN             | EAE+AN             |
| Batata Glicose Ágar (PGA)        | EAAr+PGA           | EAAI+PGA          | EAC+PGA            | EAE+PGA            |
| Ágar Sabouraud Dextrose<br>(SDA) | EAAr+SDA           | EAAI+SDA          | EAC+ SDA           | EAE+<br>SDA        |

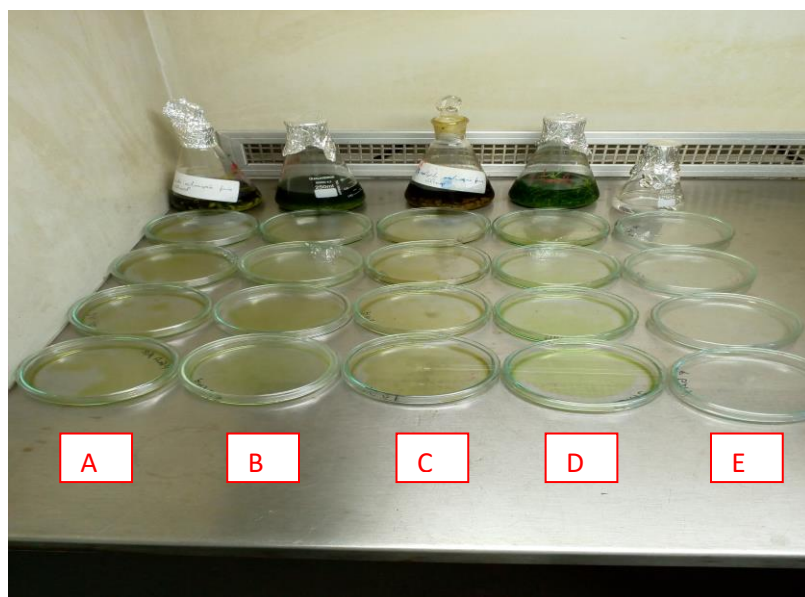
Legenda: EAAr = Extrato Alcólico de Arruda, EAAI = Extrato Alcólico de Alecrim, EAC = Extrato Alcólico de Citronela e EAE = Extrato Alcólico de Eucalipto.

As placas permaneceram com as tampas abertas, por um período de 24 horas, em capela de fluxo laminar com fluxo e lâmpada ultravioleta ligados, antes que a amostra pudesse ser inoculada.

Foi utilizado um pequeno disco de aproximadamente 5 mm de diâmetro da amostra analisada e inoculado em água peptonada seguindo as recomendações de preparo do fabricante. A partir desta diluição foi acrescido, na superfície de cada placa, 0,1 ml de cada extrato vegetal alcóolico e espalhado com o auxílio de alça de Driglasky. Vale ressaltar também, que foi feito o uso de uma alça para cada placa e para cada extrato.

Como medida de controle e análise de possíveis contaminantes ou interferência dos meios de cultura, foi elaborada mais uma placa com cada um dos meios de cultura, porém sem inoculação, assim obtendo no total quatro placas para cada meio de cultura analisado.

Após plaqueamento, as placas foram incubadas em posição invertida em temperatura de 25° C por 7 dias em estufa.



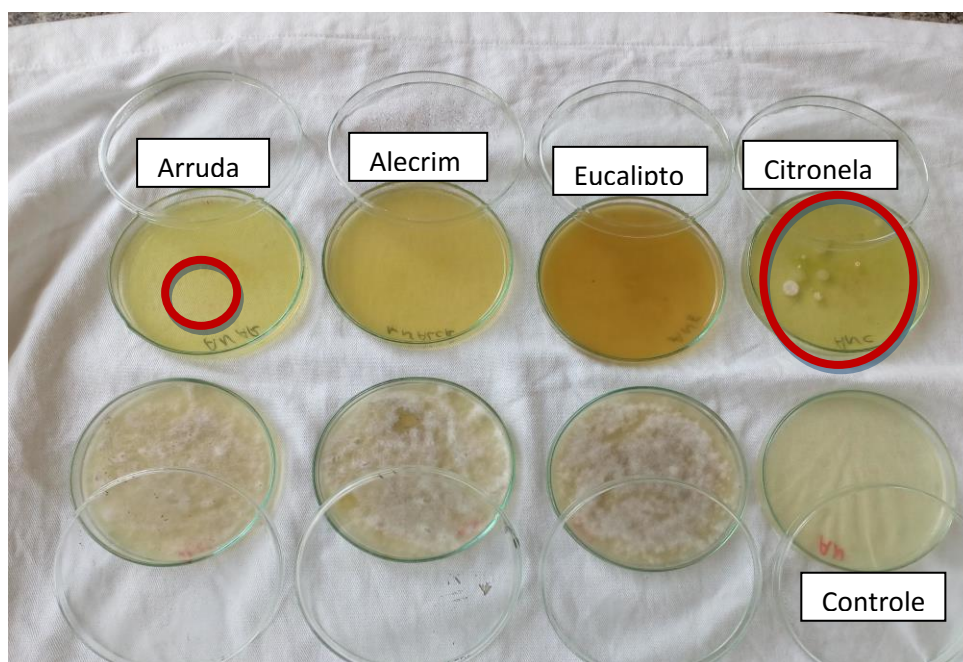
**Figura 2:** Placas com os extratos vegetais alcóolicos e álcool. (Fonte: elaboração própria). A= Extrato alcóolico de eucalipto. B= Extrato alcóolico de alecrim. C= Extrato alcóolico de arruda. D= Extrato alcóolico de citronela. E= Álcool (controle). (Fonte: elaboração própria).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor compreensão os resultados obtidos serão discutidos em tópicos separados para os testes realizados com os extratos vegetais alcóolicos (experimento I) e diferentes meios de cultura (experimento II).

##### 4.1. Teste com os extratos vegetais alcóolicos

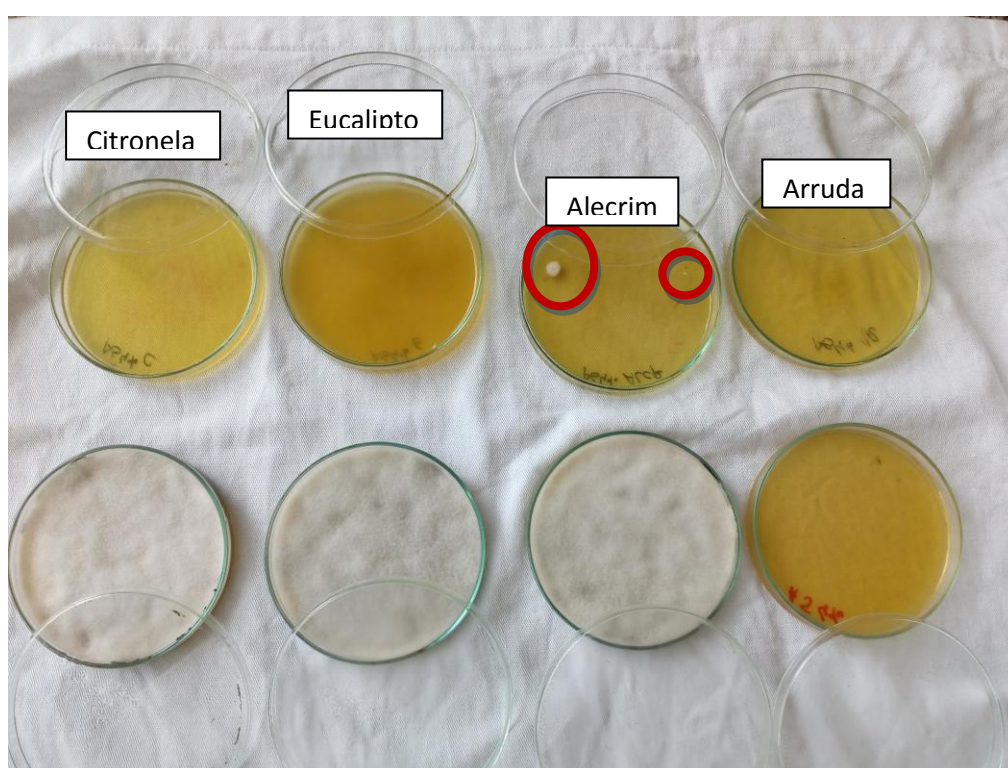
Colocou-se as amostras em triplicata dos quatro extratos vegetais alcóolicos em meio de cultura AN, perfilados em frente das amostras obtidas da inoculação de *C. gloeosporioides* no mesmo meio de cultivo e sua amostra controle, como exemplificados na Figura 3. Esse procedimento seguiu-se para o demais meios de cultura trabalhados.



**Figura 3:** Amostras abertas dos experimentos realizados em meio de cultura Ágar Nutriente (AN). (Fonte: elaboração própria).

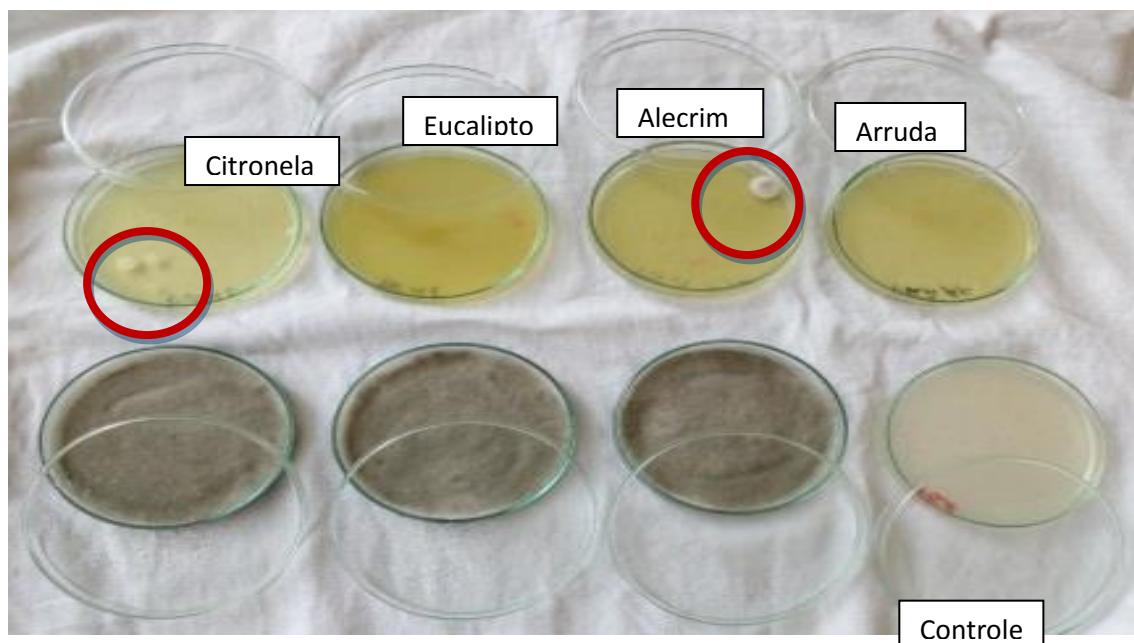
Em meio de cultura Ágar Nutriente, detectou-se crescimento de nove colônias quando associado ao extrato vegetal alcóolico de citronela e duas colônias com extrato vegetal alcóolico de arruda. As demais combinações de extratos alcóolicos de alecrim e eucalipto em meio AN apresentaram inibição plena ao fungo das amostras.

As combinações de meio AS4% adicionados extratos vegetais alcóolicos de citronela, eucalipto e arruda, inibiram totalmente o desenvolvimento do fungo estudado, porém, na placa com extrato alcóolico de alecrim, notou-se o aparecimento de duas colônias de *C. gloeosporioides*, Figura 4.



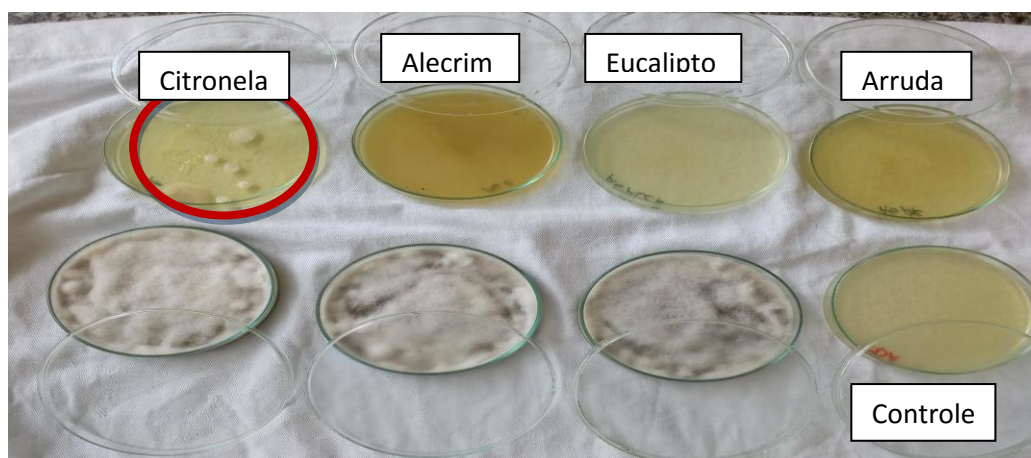
**Figura 4:** Amostras abertas dos experimentos realizados em meio de cultura Ágar Sabouraud 4 % (AS4%). (Fonte: elaboração própria).

Na Figura 5, constatou-se que no meio de cultura PGA houve duas placas com o crescimento fúngico, sendo elas: citronela com desenvolvimento de duas colônias e alecrim com uma colônia. Na presença dos extratos vegetais alcóolicos de arruda e eucalipto em meio PGA, a inibição foi, mais uma vez, total. Ressaltando o potencial antifúngico dos princípios ativos das espécies mencionadas.



**Figura 5:** Amostras abertas dos experimentos realizados em meio de cultura Batata Glicose Ágar (PGA). (Fonte: elaboração própria).

Diferente das outras combinações, o extrato alcóolico de citronela em meio SDA apresentou o crescimento de microrganismo maior do que em todas as outras formulações analisadas, Figura 6, porém com notável inibição de crescimento e desenvolvimento do fungo estudado. Observou-se o surgimento de oito colônias de *C. gloeosporioides*. Nas demais amostras, o controle foi total. Na Tabela 2 é possível verificar o número de unidades Formadoras de Colônias entre as combinações de diferentes meios de cultura e extratos vegetais alcóolicos.



**Figura 6:** Amostras abertas dos experimentos realizados em meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (SDA). (Fonte: elaboração própria).

**Tabela 2:** Número de Unidades Formadoras de colônias obtidas nas combinações entre os meios de cultura e os extratos vegetais alcóolicos. Inconfidentes, MG.

| Meios de cultura              | Extratos Alcóolicos |                   |                    |                    |
|-------------------------------|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
|                               | EAAr<br>(arruda)    | EAAI<br>(alecrim) | EAC<br>(citronela) | EAE<br>(eucalipto) |
| Ágar Sabouraud 4 % (AS)       | 0                   | 2                 | 0                  | 0                  |
| Ágar Nutriente (AN)           | 2                   | 0                 | 9                  | 0                  |
| Batata Glicose Ágar (PGA)     | 0                   | 1                 | 2                  | 0                  |
| Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) | 0                   | 0                 | 8                  | 0                  |

Legenda: EAAr = Extrato Alcóolico de Arruda, EAAI = Extrato Alcóolico de Alecrim, EAC = Extrato Alcóolico de Citronela e EAE = Extrato Alcóolico de Eucalipto.

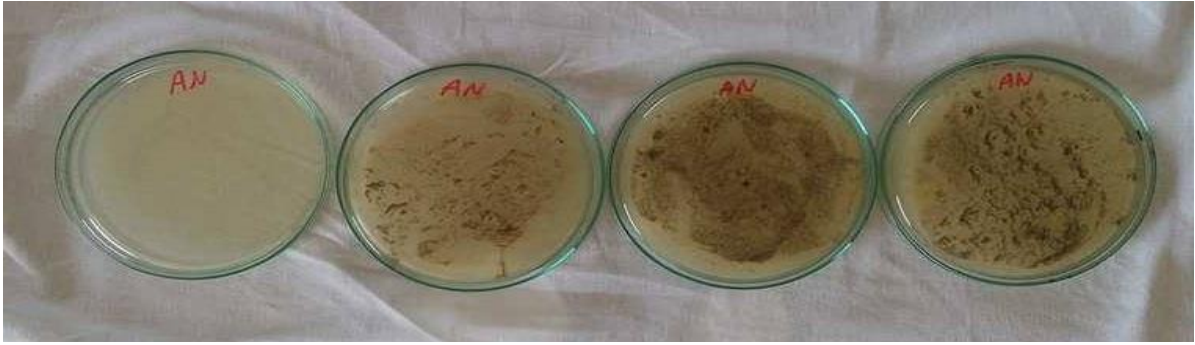
Segundo Celoto et al. (2008), os extratos de *Ruta graveolens* (arruda), *Eucalyptus citriodora* (eucalipto), *Zingiber officinale* (gengibre) e *Chenopodium ambrosioides* (erva-de-santa-maria) apresentaram a inibição em relação à germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado do mamão.

#### 4.2. Testes com os meios de cultura

Com relação ao desenvolvimento micelial, todos os meios de cultura utilizados no trabalho, mostraram-se eficientes para o crescimento do fungo. Assim, viabilizando o desenvolvimento em laboratório, com demonstrações funcionais e alternativas mais acessíveis de cultivo fúngico.

Conforme apresentado nas figuras 7, 8, 9, e 10, observa-se crescimento de *C. gloeosporioides* em todas as placas inoculadas nos meios de cultura Ágar Nutriente, Ágar Sabouraud 4 % (AS), Batata Glicose Ágar (PGA) e Ágar Sabouraud Dextrose (SDA).





**Figura 7:** Crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em AN. (Fonte: elaboração própria).



**Figura 8:** Crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em AS4%. (Fonte: elaboração própria).



**Figura 9:** Crescimento micelial de *C. gloeosporioides* PGA. (Fonte: elaboração própria).



**Figura 10:** Crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em SDA. (Fonte: elaboração própria).

Os quatro meios de cultura trabalhados foram favoráveis ao desenvolvimento micelial do fungo. Em análise aparente, não se identificou contaminação ou crescimento de outros fungos diferentes do gênero *Colletotrichum* esperado. Embora não havendo adversidades observada nas análises, destacam-se as colorações diferentes do desenvolvimento do mesmo fungo em diferentes meios de cultura.

## 5. CONCLUSÃO

Foi possível o desenvolvimento de extratos vegetais alcóolicos de arruda, alecrim, citronela e eucalipto.

Os quatro meios de cultura analisados favoreceram o crescimento do *Colletotrichum gloeosporioides de café* de maneira semelhante, porém de coloração distinta entre eles.

Os extratos vegetais alcóolicos de arruda, alecrim e citronela apresentaram controle no desenvolvimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* sem inibir 100 % o crescimento de colônias do fungo estudado, ainda assim, destacam-se os resultados obtidos, pois estes extratos vegetais alcóolicos se mostraram limitantes ao crescimento pleno do fungo, principalmente.

O extrato vegetal alcólico de eucalipto apresentou o maior desempenho, inibindo 100 % o crescimento de desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Todos os extratos vegetais alcóolicos estudados apresentam-se como alternativas no controle e desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, A.J. Guia prático de plantas medicinais. São Paulo: Universo dos Livros, 2005.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas. Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.
- BSAR – Boletim Sensorial do Agronegócio de Recife. Disponível em: <https://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/Anexos/boletim-cafe.pdf>. Acesso em março de 2017.
- CELOTO, Mercia I. B. et al, Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/asagr/v30n1/v30n1a01.pdf>. Acesso em fevereiro de 2017.
- FÁTIMA, Maria de et al. O café e o processo de modernização de São Paulo. Disponível em: <https://historiadesaopaulo.wordpress.com/582-2/>. Acesso em fevereiro de 2017.
- FERREIRA, Ana M., et al. Manual de aula práticas de microbiologia. Disponível em: [https://nenol.wikispaces.com/file/view/protocolos\\_microbiologia\\_2010.pdf](https://nenol.wikispaces.com/file/view/protocolos_microbiologia_2010.pdf). Acesso em fevereiro de 2017.
- FIRMO, W. C. A.; MIRANDA, M. V. ; OLEA, R. S. G. . Caracterização Do Estado Da Arte De Lafoensia Pacari A. St.-Hil. (Lythraceae). *Natureza On Line (Espírito Santo)*, V. 14, P. 012-022, 2016.
- PELEGRINI, L.L.; CRUZ-SILVA, C.T.A. Variação sazonal na alelopatia de extratos aquosos de *Coleus barbatus* (A.) Benth. sobre a germinação e o desenvolvimento de *Lactuca sativa* L. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu*, v.14, n.2, p.376-382, 2012.
- PREFEITURA MUNICIPAL DE INCONFIDENTES. Disponível em: <http://www.inconfidentes.mg.gov.br/index.php/geografia>. Acesso em fevereiro de 2017.
- RAMOS, I. A. Q.; ALDANA, J.; MORA, R. **A antracnose, uma doença limitante para a produção de mamão**. Disponível em: <http://www.croplifela.org/pt/protecao-de-cultivos/a-praga-do-mes-pt/antracnose-uma-doenca-limitante-para-a-producao-de-mamao.html>. Acesso em setembro de 2016.
- RODRIGUES, HELENA L. et al. **A Origem do Café no Brasil: A Semente Que Veio Para Ficar. Disponível em:** [http://revistapensar.com.br/gastronomia/pasta\\_upload/artigos/a44.pdf](http://revistapensar.com.br/gastronomia/pasta_upload/artigos/a44.pdf). Acesso em fevereiro de 2017.
- SILVA, Michele R. de O. Detecção da atividade antifúngica de extratos de plantas do manguezal de Vila Velha, Itamaracá, PE. Dissertação de Mestrado. Recife, 2004. Disponível em: <http://www.liber.ufpe.br/teses/arquivo/20041104161551.pdf>. Acesso em fevereiro de 2017.

SILVA, Michele R. L., MARQUES, Viviani V., SILVA, Daiana A., MENEGUIM, Luciana, JAYME, Nádia S., MARTINEZ, Carlos E. JUNIOR, Rui P. L. **Antracnose no café: doença emergente**. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/artigos/doenca-emergente>. Acesso em fevereiro de 2017.

SINDICAFÉ – Sindicato da Indústria do Café do Estado de Minas Gerais. Disponível em: <http://sindicafe-mg.com.br/plus/modulos/conteudo/?tac=importancia-da-cafeicultura>. Acesso em fevereiro 2017.

TEIXEIRA, Francisco N. P. História de São Paulo: 4º ou 5º ano, São Paulo, Ática, 2008.

VENTUROSO, L. R. **Extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos** ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p. 2013 2576 soja. 2009.