



Estado do Paraná

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Trichoderma viride* e
*Trichoderma stromaticum***

ELIETE MOURA DE SOUZA HURMANN

Toledo – Paraná – Brasil

2016



Estado do Paraná

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS – PPGC

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Trichoderma viride* e
*Trichoderma stromaticum***

ELIETE MOURA DE SOUZA HURMANN

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Profa. Dra. Cleide Viviane Buzanello Martins

JANEIRO/2016

Toledo – PR

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.

Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

B966a Hurmann, Eliete Moura de Souza
Atividade antimicrobiana de *Trichoderma viride* e *Trichoderma stromaticum* / Éliete Moura de Souza Hurmann. -- Toledo, PR : [s. n.], 2016.
32 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Cleide Viviane Buzanello Martins
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo. Centro de Engenharias e Ciências Exatas.

1. Ciências ambientais - Dissertações 2. Atividade anti-microbiana 3. *Trichoderma sp* 4. *Colletotrichum musae* 5. Plantas - Doenças - Controle alternativo 6. Extratos vegetais 7. Fungo fitopatogênico I. Martins, Cleide Viviane Buzanello, orient. II. T

CDD 20. ed. 632.96

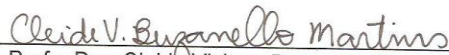
FOLHA DE APROVAÇÃO

ELIÉTE MOURA DE SOUZA HURMANN

"Atividade antimicrobiana de *Trichoderma viride* e *Trichoderma stromaticum*".

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais, Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

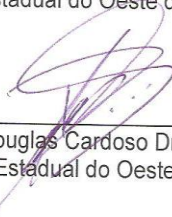
COMISSÃO EXAMINADORA



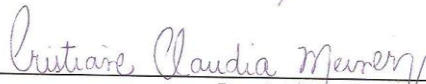
Profa. Dra. Cleide Viviane Buzanello Martins (Presidente)
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Profa. Dra. Conceição de Fátima Alves Olguin
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Prof. Dr. Douglas Cardoso Dragunski
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Dra. Cristiane Claudia Meinerz
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Bolsista PNPd)

Aprovada em : 08 de janeiro de 2016.
Local da Defesa: Auditório do GERPEL – UNIOESTE/Campus de Toledo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, os companheiros de jornada e todas as oportunidades. Ao meu pai e minha mãe, por terem sempre, me dado todo o apoio necessário, o direcionamento correto e a ênfase no desenvolvimento pessoal e profissional. A meu esposo querido pelo apoio, compreensão, resistência, paciência, persistência ao longo dos dois anos de curso, inúmeras noites fora de casa, e por me ajudar sempre a ser uma pessoa melhor, também aos meus filhos Maria Luiza e Cauan Henrique que dão sentido a minha vida. Aos meus irmãos, que são essenciais em minha vida e que tanto me apoiaram nas horas difíceis.

E finalmente a minha orientadora Profa. Dra. Cleide Viviane Buzanello Martins, pela orientação no desenvolvimento dos experimentos, estágio de docência, manuscritos e apresentação.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram nestes dois anos a fim de realizar este objetivo ao qual me propus e que hoje, final e felizmente tenho a honra de concluir.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
MATERIAL E MÉTODOS	9
<i>Desenvolvimento dos extratos</i>	9
<i>Procedimentos dos experimentos</i>	10
<i>Experimento 1. Isolamento do Colletotrichum musae</i>	10
<i>Experimento 2. Isolamento da Saprolegnia</i>	11
<i>Teste de Disco Difusão</i>	11
<i>Cultivo pareado</i>	13
<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método de diluição em microplaca</i>	14
<i>Teste in situ da banana</i>	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
<i>Cultivo pareado</i>	16
CONCLUSÃO	20
AGRADECIMENTOS	20
REFERÊNCIAS	21
ANEXOS	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Crescimento micelial (mm) dos fungos. (A) *Trichoderma stromaticum*, *Saprolegnia* e testemunha; (B) *Trichoderma viride*, *Saprolegnia* e testemunha (C); *Colletotrichum musae*, *Trichoderma stromaticum* e testemunha; (D) *Trichoderma viride*, *Colletotrichum musae* e testemunha..... 26

Figura 2: Atividade antimicrobiana (halo de inibição, mm) dos extratos de *Trichoderma viride* e *Trichoderma stromaticum* (A) *Candida cruzei* (B) *Candida albicans*; (C) *Colletotrichum musae* (D) *Saprolegnia*; (E) *Escherichia coli*; (F) *Enterobacter cloacae* (G) *Aeromonas hydrophila* (H) *Colletotrichum musae*.....27

Figura 3: Lesões em bananas orgânicas (mm) no tratamento com os extratos *Trichoderma viride* e *Trichoderma stromaticum*, fungicida comercial Manzate e controle29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Inibição do crescimento micelial dos antagonistas (%), *Trichoderma viride* e *Trichoderma stromaticum* contra *Colletotrichum musae* e *Saprolegnia* sp. em cultivo pareado.....25

Tabela 2: Concentração mínima inibitória (CMI) de extrato diclorometânico de *T. viride* para bactérias, leveduras e fungos filamentosos28

Atividade antimicrobiana de *Trichoderma viride* e *Trichoderma stromaticum*.

RESUMO

O *Trichoderma* spp. é um antagonista promissor, o desenvolvimento e uso de produtos à base deste microrganismo nos oferece a oportunidade, não apenas de reduzir os riscos da saúde, mas também custos e danos ambientais. Assim, este trabalho teve por objetivo analisar a eficiência dos extratos de *Trichoderma viride* e *Trichoderma stromaticum* contra alguns microrganismos de interesse na clínica médica, agricultura e piscicultura. Dentre eles o *Colletotrichum musae*, causador da antracnose da banana, *Saprolegnia*, que acomete ovos de peixes e algumas bactérias que causam danos à saúde humana. Os extratos diclorometânicos foram testados em várias concentrações, tendo como controle positivo um antimicrobiano comercial. A inibição do patógeno foi verificada, de forma direta pela técnica de cultivo pareado. A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada por disco-difusão e pela determinação da concentração inibitória mínima (MIC) por teste de microdiluição em caldo. Foram feitos testes *in situ* no fruto inoculando o fungo patogênico e tratados com os extratos e a análise sensorial onde foi determinada a aceitação do produto. No cultivo pareado os *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento dos patógenos sendo 0,05% de significância. No teste de disco-difusão os resultados foram positivos, sendo que para *Aeromonas hydrophila* e *E. coli* obteve-se os melhores resultados. O MIC (concentração inibitória mínima) dos extratos contra os microrganismos variou de 50% a 3,125 %. Diante dos resultados apresentados, evidenciou-se que, os extratos foram eficientes na inibição *in vitro* dos microrganismos testados, bem como sua aplicação nos frutos não alterou as características organolépticas dos mesmos.

Palavras-chave: *Trichoderma* sp.; antimicrobiano; *Colletotrichum musae*.

Antimicrobial activity of *Trichoderma viride* and *Trichoderma stromaticum*.

ABSTRACT

Trichoderma spp. is a promising antagonist, the development and use of products based on this organism gives us the opportunity not only to reduce health risks, but also costs and environmental damage. This work aimed to analyze the efficiency of *Trichoderma viride* extracts and *Trichoderma stromaticum* against some microorganisms of interest in clinical medicine, agriculture and fish farming. Among them *Colletotrichum musae*, banana anthracnose causes, *Saprolegnia*, which affects fish eggs and some bacteria that cause harm to human health. The dichlorometane extracts were tested at various concentrations, and as positive control a commercial antimicrobial. Inhibition of the pathogen was verified directly by paired cultivation technique. The antimicrobial activity of the extracts was evaluated by disk diffusion and the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution test broth. In situ tests were done in the fruit inoculating the pathogenic fungus and treated with the extracts and the sensory analysis where it was determined the acceptance of the product. In cultivation paired the *Trichoderma* spp. inhibited the growth of pathogens being 0.05% significance level. In the disk diffusion test results were positive, and for *E. coli* and *Aeromonas hydrophila* gave the best results. MIC against microorganisms of the extracts ranged from 50% to 3,125%. Given the results presented, it is concluded that the extracts were effective in in vitro inhibition of the microorganisms as well as their application in the fruits did not alter the organoleptic characteristics.

Keywords: *Trichoderma* sp.; antimicrobial; *Colletotrichum musae*.

1 **Atividade antimicrobiana de *Trichoderma viride* e *Trichoderma stromaticum*.**

2 [Preparado de acordo com as normas da revista Ceres].

3 Eliete Moura de Souza Hurmann¹, Cleide Viviane Buzanello Martins²

4 **INTRODUÇÃO**

5 As fontes alimentares mais importantes do mundo são ocupadas pelo arroz,
6 trigo, milho e a banana, sendo que este fruto ocupa a segunda posição na produção
7 global (PERREIER et al., 2011). Com uma produção de 95 milhões de toneladas a
8 cultura da banana, apresenta uma área de plantio estimada em 4,1 milhões de hectares
9 sendo cultivada em 107 países. O Brasil é o quinto maior produtor mundial de bananas.
10 Estima-se que a produção dessa fruta empregue, direta e indiretamente, 960 mil pessoas
11 no mundo (FAO, 2012).

12 Várias podridões podem ocorrer na fase de pós-colheita da banana, porém a de
13 maior destaque é dado à antracnose que é causada pelo fungo *Colletotrichum musae*,
14 que acomete principalmente a fruta madura (VENTURA e HINZ, 2002).

15 Vários estudos demonstram a eficiência no controle da antracnose por meios
16 alternativos, mas a utilização de fungicidas comerciais ainda é o mais comum (LIMA et
17 al., 2007; NOLASKO et al., 2008).

18 Segundo a FAO (2011), uma atividade que vem apresentando um crescimento
19 acelerado é a aquicultura, em especial a piscicultura, com a introdução de fazendas de
20 criação em sistema superintensivo. Os peixes são mantidos em elevada densidade de

¹Unioeste, Mestrado em Ciências Ambientais, Toledo, PR, Brasil, elietehurma@hotmail.com

²Unioeste, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Mestrado em Ciências Ambientais, Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura, Toledo, PR, Brasil, cvbmartins@gmail.com

21 estocagem, em produções superintensiva, o que propicia o estresse e imunossupressão.
22 A elevada densidade de estocagem favorece a ocorrência de infecções, uma das mais
23 ocorrentes é a saprolegniose, cujo agente etiológico é o oomiceto aquático
24 *Saprolegnia* spp. Segundo West (2006), esta doença provoca perdas massivas com
25 sérios prejuízos econômicos aos piscicultores.

26 Capazes de atuarem como agentes de controle de doenças de várias plantas
27 cultivadas, os fungos do gênero *Trichoderma* tem uma grande importância econômica
28 para a agricultura (HAGGARD 2006, FOERTES et al., 2007).

29 Segundo Gauch (1996), o *Trichoderma* pode interagir com o patógeno de
30 diversas maneiras, tais como antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência,
31 predação ou indução de defesa do hospedeiro. Para Bettioli et al., (2008), o *Trichoderma*
32 spp. é sem dúvida, o agente de controle biológico de doenças de plantas mais estudado
33 no Brasil e em outros países da América Latina.

34 Esta atividade de biocontrole é devido, principalmente à produção de enzimas
35 líticas extracelulares degradadoras da parede celular dos fungos, tais como quitinases, β -
36 1, 4-glucanases e proteases (CORABI-ABELL e LUCON, 2002).

37 Segundo Souza et al., (2011), os agrotóxicos no Brasil tiveram, a partir da
38 década de 70, seu uso estimulado com afinco por políticas de estado onde a concessão
39 de crédito agrícola era vinculado a sua aquisição, e pela oferta comercial que enaltecia
40 suas propriedades de diminuir o trabalho com pragas e de beneficiar alimentos e
41 trabalhadores.

42 A política para apoiar o uso dos agrotóxicos, não somente por agricultores com
43 maior capitalou principalmente, pequenos produtores intimidados e impulsionados por,
44 uma maior rentabilidade, contribuiu para sua utilização sem o devido controle

45 (SOARES, 2010).

46 Conforme Peres (2007), no Brasil o uso de agrotóxicos é um assunto alarmante,
47 os alimentos consumidos pela população possuem altas taxas de produtos químicos e
48 que vão contaminando gradativamente o meio ambiente, o solo, os lençóis freáticos e os
49 rios seguindo a cadeia alimentar até causar danos à saúde humana e ambiental.

50 Neste contexto em que a busca por métodos alternativos que diminuam a
51 utilização de produtos nocivos e ao mesmo tempo tragam rentabilidade para a atividade
52 do produtor e sendo o *Trichoderma* spp. um antagonista promissor e agente de
53 biocontrole de doenças de plantas e por produzir enzimas líticas é que foi proposto este
54 trabalho com o objetivo de avaliar a eficiência do extrato de *Trichoderma viride* e
55 *Trichoderma stromaticum* contra alguns microrganismos patogênicos.

56 MATERIAL E MÉTODOS

57 O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade
58 Oeste do Paraná (Unioeste), *Campus* Toledo - PR e Laboratório de Biotecnologia da
59 Pontifícia Universidade Católica (PUC), *Campus* Toledo – Pr

60 *Desenvolvimento dos extratos*

61 O extrato foi desenvolvido a partir das espécies *Trichoderma viride* e
62 *Trichoderma stromaticum* provenientes do Laboratório de Microbiologia da
63 Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

64 Para a obtenção dos extratos foi seguida a metodologia proposto por ROSA et
65 al., (2013). Para tanto os fungos foram repicados em aproximadamente 30 placas de
66 Petri (90 mm de diâmetro) contendo 20 mL de meio de cultura BDA (batata, dextrose e

67 ágar). As placas foram incubadas por 15 dias, a 28°C em estufa BOD (demanda
68 bioquímica de oxigênio). Foram cortados o meio de cultura juntamente com os micélios
69 das colônias crescidas, em pequenos fragmentos e transferidos os mesmos para frascos
70 de vidro tipo Erlenmeyer de 150 mL. Os frascos foram tapados com uma folha de papel
71 toalha e armazenados por 24 horas a -80°C como preparação para a etapa seguinte. Os
72 fragmentos foram submetidos à liofilização, separadamente conforme a espécie de
73 fungo, para remoção da água por 5 dias ou até os mesmos apresentarem um aspecto
74 seco, como “flocos de aveia”. Após o processo de liofilização foi acondicionado em
75 Erlenmeyer de 500 ml e acrescentado o diclorometano até que o mesmo cobrisse a
76 massa de fragmentos secos. Posteriormente este processo, vedou-se com rolha simples
77 envolta por papel alumínio. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente. Após 3
78 a 4 dias, o conteúdo foi filtrado com papel filtro. A seguir, foi novamente acrescentado o
79 diclorometano até cobrir a massa de fragmentos secos e após 3 a 4 dias, filtrado
80 novamente. O extrato obtido foi concentrado e seco com auxílio do Rotavapor, onde foi
81 retirado todo o diclorometano. Ao fim do procedimento, armazenado o produto a -
82 20°C. O extrato obtido foi pesado em balança analítica e a quantidade de massa obtida
83 foi de 23 gramas de cada espécie de fungos e armazenado para uso posterior.

84 *Procedimentos dos experimentos*

85 *Experimento 1. Isolamento do Colletotrichum musae.*

86 Para isolamento do *Colletotrichum musae* diretamente da casca da banana foi
87 seguido a metodologia de Tuite (1969).

88 Foram aproximadamente 10 bananas, adquiridas em supermercado da cidade de

89 Toledo – Pr. Foram colocadas em temperatura ambiente e após 12 dias começaram a
90 apresentar a antracnose, o aspecto da casca ficou escura e com manchas alaranjadas. O
91 fungo foi isolado diretamente do fruto com auxílio de uma alça de platina em 8 placas
92 de Petri, com meio de cultura BDA e incubadas em BOD por 7 dias a uma temperatura
93 de 28°C, após este período o fungo havia tomado toda placa apresentando filamentos e
94 apressórios, com crescimento visíveis de hifas com uma coloração alaranjada.

95 ***Experimento 2. Isolamento da Saprolegnia***

96 Para isolamento da *Saprolegnia* foi feito um esfregaço por meio de um swab
97 diretamente no Jundiá (*Rhamdia quelen*), coletando uma quantidade de muco com
98 crescimento visível de hifas de aspecto cotonoso (algodão) e espalhado diretamente na
99 placa de Petri contendo meio BDA com cloranfenicol, para inibir o crescimento de
100 bactérias. Foi incubado em BOD por 8 dias à 28°C, após este período o micélio havia
101 tomado toda placa com hifas longas, formando chumaço de algodão, com uma
102 coloração esbranquiçada.

103 ***Cultivo pareado***

104 Para avaliar o antagonismo entre *Trichoderma viride* e *Colletotrichum musae*,
105 *Trichoderma viride* e *Saprolegnia*, *Trichoderma stromaticum* e *Colletotrichum musae*,
106 *Trichoderma stromaticum* e *Saprolegnia*, realizou-se o teste do pareamento de culturas
107 através da metodologia de cultura pareada (DENNIS; WEBSTER, 1971 ab). Em placas
108 de Petri contendo meio de cultivo BDA, foram depositados quadrados de micélio de 6
109 mm² de área de cada fungo, ambos a 2,0 cm de distância da borda da placa, em
110 posições opostas. Os quadrados foram obtidos de culturas puras, as quais foram

111 incubadas à temperatura de 28°C, conforme Amin et al., (2010), por 10 dias,
112 calculando-se os valores médios de porcentagem de inibição em relação à testemunha,
113 que recebeu apenas os patógenos *Colletorichummusae* e a *Saprolegnia*. A porcentagem
114 da inibição do crescimento foi calculada usando a fórmula: Porcentagem de Inibição =
115 $[(C - T)/C] \times 100$, onde; C= crescimento radial do controle; T= crescimento radial do
116 tratamento (MENTEL et al., 1976; SILVA et al., 2008). Também foram atribuídas
117 notas baseadas na escala de Bell, Wells, Markham (1982), que estabelece o grau de
118 antagonismo por meio da divisão em cinco classes de notas para diferenciação de níveis
119 de antagonismo (notas: 1: controle total; 2: controle de 75%; 3: controle de 50%; 4:
120 controle de até 25%; 5: ausência de controle). O experimento foi disposto em
121 delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram
122 submetidos ao teste de covariância, onde a variância é o tempo. Foram realizadas as
123 comparações das médias de crescimento do patógeno em relação ao antagonista, com
124 auxílio, computacionais do programa Statistica.

125

126 *Teste de disco-difusão*

127 A metodologia de disco-difusão foi realizada de acordo com as normas
128 padronizadas da técnica para execução da prova conformemanual da Clinical and
129 Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013).

130 Para o Teste de disco-difusão foram selecionadas 3 espécies de bactérias que
131 estavam armazenadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade do Oeste do
132 Paraná – Campus Toledo e 4 espécies defungos entre eles, duas espécies de leveduras.

133 As bactérias foram reativadas em meio de cultura NA (Nutriente Ágar) e feito o
134 experimento após 24 horas, as leveduras foram reativadas e após 48 horas feito o
135 experimento e os fungos foram repicados em placas de Petri, com meio BDA e
136 experimento realizado após 7 dias.

137 O inóculo foi preparado em solução salina 0,85%, e ajustado sua turbidez de
138 acordo com a solução padrão de MacFarland 0,5.

139 O meio de cultura usado para bactérias foi o Agar Müller-Hinton e para os
140 fungos o Agar Müller-Hinton modificado pela adição de 20 mg de dextrose e 2 mg de
141 azul de metileno.

142 Foi espalhada nas placas uma alíquota destes microrganismos com swab e
143 colocado cinco discos sendo que, em cada disco foi adicionado 0,5 µL dos extratos, em
144 três concentrações diferentes. Como controle foram utilizados discos de antimicrobianos
145 disponíveis no mercado, sendo o cloranfenicol na concentração de 30 µg em cada disco
146 e Fluconazol de 150 mg diluídos em 120 ml de água para bactérias e fungos
147 respectivamente.

148 Após este processo as placas foram incubadas na BOD a 35°C para bactérias e
149 após 24 horas foram feitas as medições dos halos, com auxílio de régua e o resultado
150 expresso em (mm). Os fungos, foram incubados em BOD a 28°C e feitas as medições
151 com auxílio de régua em mm, após 48 horas para leveduras e 7 dias para os
152 filamentosos. Neste experimento foram utilizados 7 microrganismos entre bactérias,
153 fungos filamentosos e leveduras.

154 As bactérias utilizadas foram *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*,
155 *Escherichia coli*. As leveduras utilizadas foram *Candida tropicalis*, *Candida krusei*. Os
156 fungos filamentosos utilizados foram *Colletotrichum musae*, e o oomiceto *Saprolegnia*

157 spp.O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 3
158 repetições.

159 ***Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método de***
160 ***diluição em microplaca***

161 Para os microrganismos sensíveis aos extratos de *Trichoderma viride* e
162 *Trichoderma stromaticum*, foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias.
163 Primeiramente preparou-se os meios de cultura, sendo para bactérias o caldo Müller-
164 Hinton e para os fungos o caldo Müller-Hinton modificado pela adição de 20 mg de
165 dextrose e 2 mg de azul de metileno.O inóculo foi preparado em solução salina 0,85%, e
166 ajustado sua turbidez conforme a solução padrão de MacFarland 0,5 (10^8 UFC/mL). A
167 seguir, diluiu-se a suspensão bacteriana 1:10 em caldo Muller-Hinton, obtendo-se como
168 inóculo 10^7 UFC/mL para a suspensão de levedura e fungos filamentosos diluiu-se 1:50
169 seguida da diluição 1:20 em caldo Muller Hinton modificado, obtendo-se um inóculo de
170 10^5 UFC/mL. Foram distribuídos 100 μ L do meio de cultura contendo os inóculos em
171 cada poço da placa de microdiluição, a seguir acrescentou-se 100 μ L da solução de cada
172 extrato no primeiro poço, e após a homogeneização, transferiu-se até o quinto poço
173 sucessivamente, obtendo-se as concentrações finais de: 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12%. As
174 microplacas foram incubadas a temperatura de 35°C por 24h para bactérias, 28°C por 2
175 dias para leveduras e 7 dias para fungos filamentosos. A determinação do CIM consistiu
176 em analisar a placa, onde observou-se a menor concentração do extrato capaz de causar
177 inibição total e parcial do crescimento conforme as recomendações do manual da

178 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002; CLSI, 2003). Para auxiliar na
179 leitura dos resultados foi utilizado, uma solução preparada com o corante resazurina em
180 que a coloração rosa indica crescimento microbiano e a coloração azulada indica
181 ausência de crescimento microbiano.

182 *Teste in situ da banana*

183 Para avaliar a eficiência dos extratos de *Trichoderma* spp. Foram utilizadas
184 bananas Prata anã que foram adquiridas de um agricultor de produtos orgânicos na
185 região oeste do Paraná, no estágio de maturação 1(verde). No preparo das frutas
186 utilizadas neste experimento, as pencas foram separadas em dedos e lavadas com
187 detergente e água corrente, após estarem secos foram desinfetados com borrifado de
188 hipoclorito de sódio(1,5%) e após 15 minutos, lavados com água destilada e esterilizada
189 e secas naturalmente. Para tanto separou-se 18 dedos das bananas sendo utilizadas 6
190 para cada tratamento, totalizando 3 tratamentos, com três repetições. A inoculação do
191 patógeno foi feita em 3 bananas de cada tratamento que consistiu na abertura de um
192 orifício, no centro dos dedos, de aproximadamente 3 mm de diâmetro e 3 mm de
193 profundidade no epicarpo da fruta, com auxílio de um vazador e escalpelo, onde foi
194 inserido um disco de mesmo diâmetro que foi retirado da borda da colônia do patógeno
195 desenvolvido em meio de cultura BDA + antibiótico cloranfenicol. Depois de 5 horas de
196 inoculação do patógeno os dedos foram tratados com os extratos de *Trichoderma viride*
197 e *Trichoderma stromaticum* e o fungicida comercial (Manzate) respectivamente, sendo
198 que uma foi o controle e as outras duas obtinham somente os extratos para posterior
199 teste sensorial. Seguindo o tratamento, os dedos foram colocados em bandejas plásticas,
200 previamente desinfetadas, para secagem, sendo posteriormente transferidos para outras

201 bandejas forradas com papel de filtro, contendo um chumaço de algodão,umedecido
202 com água esterilizada e recoberta com filme plástico. Estas bandejas foram mantidas em
203 câmaras de refrigeração a temperatura de 16°C e umidade relativa a 95%. Após 8 dias
204 foram feitas as medições através da determinação do tamanho das lesões, com auxílio
205 de um paquímetro analógico e os quatro dedos com o inóculo foram descartados no
206 estágio 7 de maturação (amarelo com pontas marrom). O delineamento foi totalmente
207 casualizado, com três repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância,
208 Anova.

209 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

210 *Cultivo pareado*

211 No teste de pareamento entre os microrganismos *Trichoderma viridee*
212 *Trichoderma stromaticum*, contra *Colletotrichum musae* e *Saprolegnia* sp., observou-se
213 que o antagonismo da *Trichoderma* spp. sobre os patógenos foi estatisticamente
214 significativo. As duas espécies de *Trichoderma* apresentaram um crescimento rápido,
215 onde no 6º dia constatou-se o ápice de seu crescimento micelial o qual ocupou mais de
216 55% das placas em relação aos patógenos, onde através da porcentagem da inibição do
217 crescimento foi calculada usando a fórmula: Porcentagem de Inibição = $[(C - T)/C] \times$
218 100, onde; C= crescimento radial do controle; T= crescimento radial do tratamento
219 (MENTEL et al., 1976; SILVA et al., 2008), como pode ser observado na Tabela 1 em
220 relação as testemunhas (*Colletotrichum musae* e *Saprolegnia*), que tiveram seu
221 crescimento no início de forma lenta, mas que a partir do 6º dia tiveram seu crescimento
222 micelial de forma mais acelerada por não estar competindo por espaço ou nutrientes.

223 Esta inibição, apontada neste trabalho, vem de encontro com resultados obtidos por
224 outros autores como Oliveira (2009) Ajith e Lakshmidēvi (2010), indicando que o
225 parasitismo direto e outros mecanismos estão envolvidos na ação de antagonismo do
226 fungo do gênero *Trichoderma* como competição e antibiose descrito por Fravel (2005).
227 Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os mesmos encontrados por
228 Bonett et al., (2013), onde o *T. viride* também antagonizou o *C. musae* em 57 e 50 %,
229 esta inibição ocorre devido ao antagonista ter um crescimento rápido sobre o patógeno,
230 muitas vezes pelo estímulo do próprio hospedeiro. Ainda segundo Bonett (2013), o
231 *Trichoderma* acaba vencendo o patógeno por competição, espaço ou por nutrientes.
232 Conforme Louzada et al., (2009) as espécies de *Trichoderma* atuam como parasitas em
233 uma ampla gama de fitopatógenos e como agentes usados no biocontrole de doenças de
234 plantas.

235 Conforme a Tabela 1, o *T. stromaticum*, assim como o *T. viride*, apresentou um
236 crescimento micelial onde estabilizou em relação ao patógeno a partir do 6º dia. A
237 *Saprolegnia* é um oomiceto que infecta ovas de peixes causando perdas irreparáveis na
238 piscicultura, Larralde-Corona et al., (2008), afirma que os *Trichoderma* sp. são capazes
239 de degradar micélio e microescleródios de *Macrophomina phaseolina*, formando uma
240 estrutura em formato gancho que enrolando-se nas hifas do patógeno impede seu
241 crescimento, este formato pode explicar o resultado obtido, pois a *Saprolegnia* acaba
242 formando um chumaço de algodão, segundo Siqueira (2004), pois as hifas desses
243 fungos crescem de tal maneira, para fora do corpo do peixe, que parecem amontoados
244 de algodão. Silva et al., (2008) constataram no teste de pareamento que o antagonismo
245 exercido pelos isolados de *T. stromaticum*, *T. viride* e *T. virens* foi maior por
246 hiperparasitismo onde o *T. stromaticum* ocupou 52% na média de crescimento, este

247 resultado vem confirmar o resultado deste trabalho onde a média de crescimento foi 57,
248 26% como podemos observar na Tabela 1.

249 Os gráficos respresentados na Figura 1, mostram a velocidade do crescimento
250 micelial em (mm) dos antagonistas em relação aos patógenos, podemos comprovar que
251 nas figuras A, B, C e D a testemunha começa seu crescimento de forma lenta e que a
252 partirdo 6º dia, a velocidade aumenta devido a falta de competitividade por nutrientes e
253 espaço ao contrário dos antagonistas e patógenos que competem entre si.
254 Estatisticamente diferiram entre si, onde o valor de *P* foi avaliado pelo teste Statística e
255 o valor de *P* avaliado pelo ANCOVA.

256 Nos testes de disco-difusão os resultados para os 07 microrganismos
257 testadostiveram um menor halo de inibição, comparando com o fungicida comercial, em
258 função de ser o extrato bruto e asubstância que está inibindo este crescimento ainda ser
259 desconhecida, cabe aqui um estudo aprofundado sobre qual substância está causando
260 esta inibição e em que concentração. O teste de disco-difusão dos extratos contra a
261 *Saprolegnia* foi significativo 0,05%, os extratos diferiram do controle demonstrando
262 assim,atividade antimicrobiana dos mesmos (Figura 2, gráfico D). Entre as três
263 concentrações, a menor concentração (10%), teve resultado significativo sobre o *C.*
264 *musae* (Figura2, gráfico H), então pode se dizer que, o efeito sobre o patógeno é
265 positivo. Este efeito em 10% e não nas concentrações superiores pode ser explicado
266 pelo efeito paradoxal de antimicrobianos, como por exemplo, caspofungina onde o
267 aumento da concentração do antimicrobiano diminui a atividade do mesmo
268 (FERREIRA et al., 2009). Este trabalho difere de outros, pois foi usado o extrato rico
269 em metabólitos secundários para inibição dos patógenos entre eles podemos citar: ácido
270 harziânico, alameticinas, antraquinonas, azafilonas, daucanas, harzialactonas,

271 bisorbicillinoídes, butenolídes, tricholína, glisopreninas, ácido heptelídico, gliovirina,
272 pironas, tricotecenos, isocianatos, trichosetina, virídina, peptaíboles, entre outros,
273 enquanto a maioria dos trabalhos com *Trichoderma* spp. Utiliza-se dos micélios e
274 esporos desta espécie de antagonista.

275 A estatística usada para os resultados foi a ANOVA e o teste de Tukey à 0,05%
276 com programa Estatística e quando não atingiu o pressuposto de homogeneidade de
277 variância foi feito de variância similar não paramétrico - Kruskal-Wallis, ANOVA.

278 Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi verificado a
279 atividade antimicrobiana dos extratos em 7 microrganismos sendo 3 bactérias, 2 fungos
280 filamentosos e 2 leveduras. A Tabela 2 apresenta os resultados de CIM para os extratos
281 de *T. viride* e *T. stromaticum*, onde podemos observar que para todos os
282 microrganismos os extratos tiveram resultados positivos nas concentrações testadas. O
283 extrato de *T. stromaticum* foi três vezes mais eficiente do que o extrato de *T. viride* pois
284 observou-se 3,125% para todas as bactérias, isto aconteceu na *E. coli* também quando
285 seu MIC foi 6,25%, enquanto que o extrato de *T. viride* o CIM foi nas menores
286 concentrações para leveduras diferentemente do extrato de *T. stromaticum* e ainda
287 mostrando sua eficiência para os fungos onde se destaca o *C. musae* na concentração de
288 25%.

289 O CIM para fungos e bactérias de óleos essenciais de Lauraceae foram
290 estudados por Simié et al., (2004), as menores concentrações foram as que inibiram o
291 crescimento dos fungos, diferentemente dos resultados deste trabalho onde as menores
292 concentrações inibiram o crescimento das bactérias e de fungo também. O extrato de
293 alho (*Allium sativum*) foi testado sua atividade antifúngica em microplacas, Testados em
294 frutos de espécie à família *Arecaceae* (*Palmae*) e usando metodologia de microdiluição

295 em caldo, observou-se que a atividade antimicrobiana aumentou a diminuição da
296 polaridade dos extratos de *Syagrus oleracea*, este resultado foi devido a presença de
297 ácidos graxos (SILVEIRA et al., 2005).

298 O teste *in situ* banana foi avaliado e não foi observado o resultado esperado
299 devido a quantidade de réplicas que não foram suficientes. Como podemos observar na
300 Figura 3, o diâmetro da lesão de todos os tratamentos, não diferenciaram entre si, mas
301 diferenciaram do controle, mesmo tendo temperatura e umidade controlada por BOD. O
302 inóculo nas bananas não tiveram desenvolvimento conforme esperado, apenas em um
303 controle do tratamento Manzate fungida comercial, observou-se que o inóculo *C. musae*
304 desenvolveu-se além do esperado impossibilitando a medição, que foram feitas com
305 auxílio de um paquímetro no 8º dia na maturação 7. As bananas apresentaram uma
306 aparência normal quando comparada com a inoculação do patógeno, mostrando uma
307 lesão com diâmetro pequena. Ao avaliar a ação de espécies de *Colletotrichum* isoladas
308 de diferentes frutas (PERES et al., 2002) observou que sete dias após a inoculação,
309 todas as frutas inoculadas apresentaram incidência de *C. musae* e as frutas inoculadas
310 com *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum* spp. não apresentaram sintomas da
311 doença comparadas aquelas inoculadas com isolados do hospedeiro de origem. Estes
312 resultados mostraram a especificidade e a importância do *C. musae* como causador da
313 antracnose em bananeiras. Neste experimento, os resultados não diferiram entre si,
314 quando submetidos à ANOVA, seguida de teste de Tukey à 0,5%.

315 CONCLUSÃO

316 Ao final de todos os testes realizados com os extratos obtidos com *T. viride* e *T.*
317 *stromaticum* pode-se afirmar que estes extratos foram eficientes no controle das

318 espécies de bactérias, fungos e leveduras usadas neste trabalho. A determinação da
319 concentração inibitória mínima foi promissora principalmente para bactérias, indicando
320 a necessidade de experimentos adicionais e a necessidade de isolamento do composto
321 responsável pela inibição. Os extratos demonstraram que para cada microrganismo a
322 inibição depende da concentração usada, por ser um extrato bruto.

323 **AGRADECIMENTOS**

324 Ao assistente do Laboratório de microbiologia Fernando, pela disposição e
325 prontidão em responder minhas solicitações.

326 Aos colegas Édela e João pela ajuda e auxílio nas análises microbiológicas e em
327 todas as horas em que foram solicitados.

328 A fundação Araucária pela concessão da Bolsa de estudos nestes últimos seis
329 meses.

330 **REFERÊNCIAS**

331 Ajith PS, Lakshmidivi N (2010) Effect of volatile and non-volatile compounds from
332 *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of Anthracnose on Bell
333 peppers. Nat. and Sci., 8: 265-268.

334 Amin F et al. (2010) Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven
335 fungal plant pathogens in-vitro. J. Phytolog., 2: 34-37.

336 Bettiol W (2008) Métodos Alternativos para o Controle de Doenças de Plantas.
337 In: Bettiol W, Ghini R, Morandi MAB, Stadnik MJ, Kraus U, Stefanova M, Prado
338 AMC(2008) Controle biológico de doenças de plantas na America Latina. FEALQ. 303-
339 331 p.

340 Bonett LP et al. (2013) Biocontrole in Vitro de *Colletotrichum musae* por Isolados de
341 *Trichoderma* spp. Uniciências, 17: 5-10.

342 Callou MJA, Miranda RCM, Feitosa TR, Arruda FVF, Nascimento MS, Gusmão ND
343 (2012) Avaliação da atividade antimicrobiana da casca de *Mimosa caesalpinifolia*
344 Benth (Sábida). Scientia plena 8: 1-7.

- 345 Catão RMR, Barbosa-Filho JF, Lima EOL, Pereira MSVP, Silva MAR, Arruda TA,
346 Aantunes RMP (2010) Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de
347 riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus*
348 *aureus*. Revista Brasileira de Ciências Agrárias 42: 9-14.
- 349 Corabi-Adell C, Lucon CMM & Koike CM (2002) Biodiversidade do gênero
350 *Trichoderma* no estado de São Paulo – aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador.
351 Arquivos do Instituto Biológico 69: 158-191.
- 352 Dennis C, Webster J (1971a) Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*.
353 I - Production of non-volatile antibiotics. Trans. Brist. Mycol. Soc., 57: 25-39.
- 354 Eloff JN (1998) A sensitive and quick microplate method to determine the minimal
355 inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Med 64: 711-713.
- 356 FAO (2011) FISHSTAT PLUS: Universal software for fishery statistical time series.
357 Version 2.3.2000. Rome: Fisheries Department Fishery Information, Data and Statistics
358 Unit.
- 359 FAO (2012). Food and Agricultural Organization. Disponível em: Acesso em: 01 agosto
360 de 2015.
- 361 Foertes FO, Silva ACF, Almança MAK, Tedesco SB (2007). Promoção de
362 enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. Rev.
363 *Árvore* 31:221-228.
- 364 Fravel DR (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. Ann. Rev.
365 *Phytopathol.* 43: 337-359.
- 366 Ganga RMD (2002) Resultados parciais sobre o comportamento de seis cultivares de
367 banana (*Musa* spp) em Jaboticabal. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 17. Belém.
368 Anais... Belém EMBRAPA/DDT, 2002, CD-ROM.
- 369 Gauch F (1996) Micoparasitismo de espécies de *Pythium* com oogônio equinulado e o
370 controle de *Pythium ultimum* Trow causador de tombamento de mudas, em hortaliças.
371 94 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília.
- 372 Larralde-Corona CP, Santiago-Mena MR, Sifuentes-Rincon AM, Rodriguez-Luna IC,
373 Rodriguez-Perez MA, Shirai K, Narvaez-Zapata JA (2008) Biocontrol potential and
374 polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina*
375 *phaseolina* isolated from sorghum and common bean. Applied Microbiology and
376 Biotechnology, Münster, 80: 167-177.
- 377 Lima LC, Dias MSC, Castro MV, Ribeiro Júnior PM, Silva EB (2007) Controle da
378 antracnose e qualidade de mangas (*Mangifera indica* L.) cv. haden, após tratamento
379 hidrotérmico e armazenamento refrigerado em atmosfera modificada. Ciência e
380 Agrotecnologia, 31: 298-304.
- 381 Louzada GAS et al. (2009) Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de
382 diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. Biot.

- 383 Neotr., 9: 145-149.
- 384 Menten JOM (1976) Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de
385 *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". Fitopat Bras., 1: 57-66.
- 386 Michereff SJ & Barros R (Eds) Proteção de Plantas na Agricultura.
- 387 Mohamed HALA, Haggag WM (2006) Biocontrol potential of salinity tolerant mutants
388 of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. Braz. J. Microbiol. 37(2):181-
389 191. Phytopathology 62: 442-447.
- 390 Nolasco CA, Salomão LCC, Cecon PR, Bruckner CH, Rocha (2008) A Qualidade pós-
391 colheita de banana 'Prata' tratada por hidrotermia. Ciência e Agrotecnologia, 32: 1575-
392 1581.
- 393 Oliveira ES (2009) Extratos e óleos essenciais vegetais, microorganismos antagonistas,
394 indutores de resistência e produtos antissépticos no controle da antracnose em banana.
395 Fortaleza: UFC.
- 396 Perrier X, Bakry F, Carreel F et al. (2009) Combining biological approaches to shed
397 light on the evolution of edible bananas. Ethnobotany Research and Applications, Fort
398 Worth, v.7, p.199-216. Phytother Res 18: 713-717.
- 399 Rosa et al. (2013) *Coniochaete talignaria*: antifungal activity of the cryptic endophytic
400 fungus associated with autotrophic tissue cultures of the medicinal plant *Smilax
401 sonchifolius* (Asteraceae).
- 402 Silva KS et al. (2008) Atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. ao
403 fungo *Phytophthora citrophthora*. Semina Ciênc. Agrar., 29: 749-754.
- 404 Silva KS, Rebouças TNH, Bomfim MP, Silva DS, São José AR, Benett CGS (2008)
405 Atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora
406 citrophthora*. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 29: 749-754.
- 407 Silveira CS, Pessanha CM, Lourenço MCS, Neves Júnior I, Menezes FS, Kaplan MAC
408 (2005) Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*.
409 Rev Bras Farmacogn 15: 143-148.
- 410 Simié A, Sokovic M, Ristic M, Grujic-Jovanovic S, Vukojevic J, Marin P (2004) The
411 chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities.
- 412 Siqueira ADD (2004) Saprolegnirose: doença fúngica em peixes. Monografia
413 (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Centro Universitário da Fundação de Ensino
414 Octávio Bastos. São João da Boa Vista, SP. Disponível em
415 <http://64.233.161.104/search?q=cache:OthaIRV5ze0J:www.feob.br/novo/cursos/cbiologicas/monografias/Monografia%2520-%2520Amanda%2520Danziger%2520Darr%C3%B3z%2520Siqueira.pdf+saprolegnirose&hl=pt-BR&gl=br&ct=clnk&cd=3>. Acessado em: 05 de maio de 2015.
- 419 Soares WL (2010) Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma

- 420 avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura. 2010.
421 Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro.
- 422 Souza A, Medeiros AR, Souza AC, Wink M, Siqueira IR, Ferreira MB, Fernandes L,
423 Hidalgo MPL, Torres ILS(2011) Avaliação do impacto da exposição a agrotóxicos
424 sobre a saúde de população rural Vale do Taquari (RS, Brasil). *Ciência & Saúde*
425 *Coletiva*, 16: 3519-3528.
- 426 Tuite J (1969) *Plant pathological methods: fungi and bacteria*. Mineapolis: Burgess,
427 239p.
- 428 Ventura JÁ, Hinz RH (2002) Controle das doenças da bananeira. In: Zambolin L, Vale
429 FXR, Monteiro AJA, Costa H. *Controle de doenças de plantas fruteiras*. Viçosa, MG:
430 UFV, p.839-926.
- 431 West P (2006) *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fi shy appetite: new
432 challenges for an old problem. *Mycologist*, v.20, p.99-104. Disponível em: Acessado
433 em: 17 abr. 2012. doi: 10.1016/J.mycol.2006.06.004.

Tabela 1: Inibição do crescimento micelial dos antagonistas (%), *Trichoderma viride* e *Trichoderma stromaticum* contra *Colletotrichum musae* e *Saprolegnia* sp. em cultivo pareado.

Tratamentos	% de inibição/dia (Escala de Bell)		
	6°	8°	10°
<i>C. musae</i> X <i>T. viride</i>	40,85	56,88	56,88 (3)
<i>C. musae</i> X <i>T. stromaticum</i>	23,03	55,23	57,26 (3)
Testemunha*	59,08	69,2	89,37 (1)
<i>Saprolegnia</i> X <i>T. viride</i>	79,33	88,66	88,66 (1)
<i>Saprolegnia</i> X <i>T. stromaticum</i>	55,4	58,09	60,11 (3)
Testemunha**	69,05	88,3	89,26 (1)

* *Colletotrichum musae*; ***Saprolegnia*.

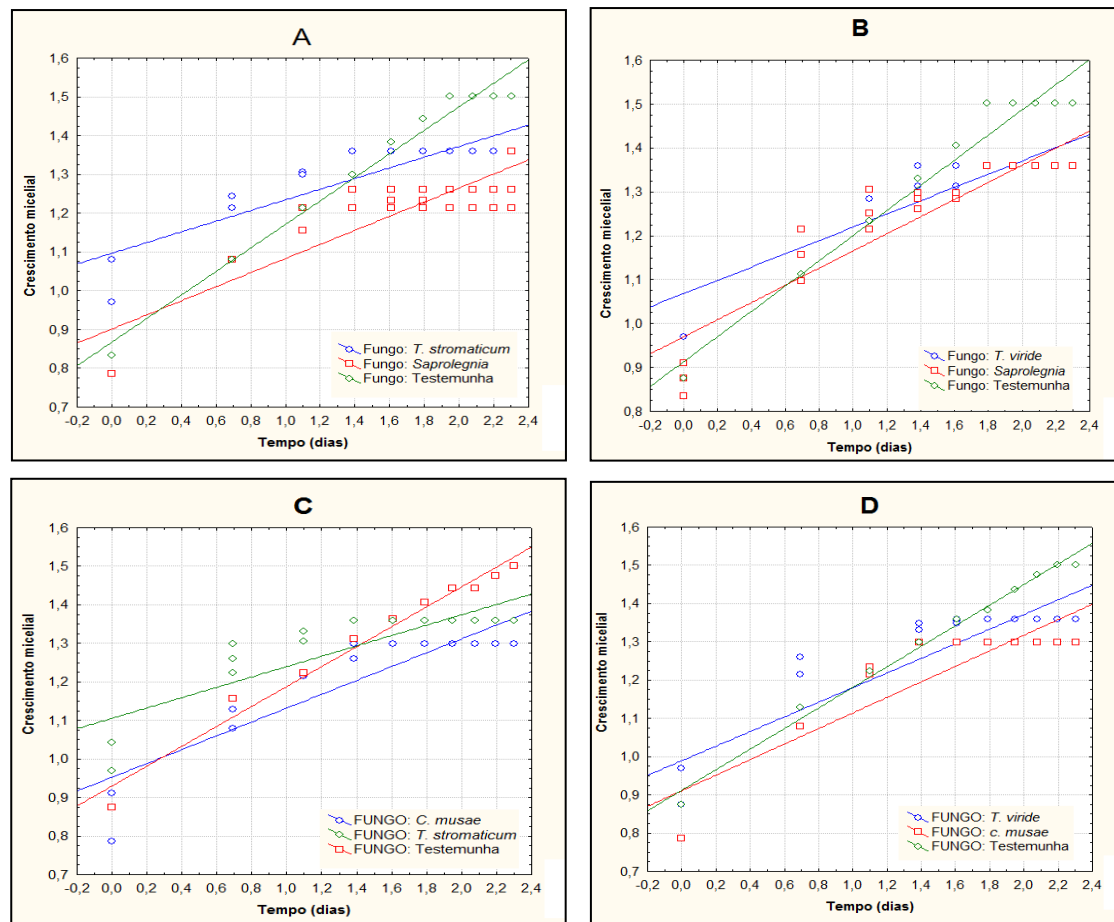


Figura 1: Crescimento micelial (mm) dos fungos. (A) *Trichoderma stromaticum*, *Saprolegnia* e testemunha; (B) *Trichoderma viride*, *Saprolegnia* e testemunha (C); *Colletotrichum musae*, *Trichoderma stromaticum* e testemunha; (D) *Trichoderma viride*, *Colletotrichum musae* e testemunha.

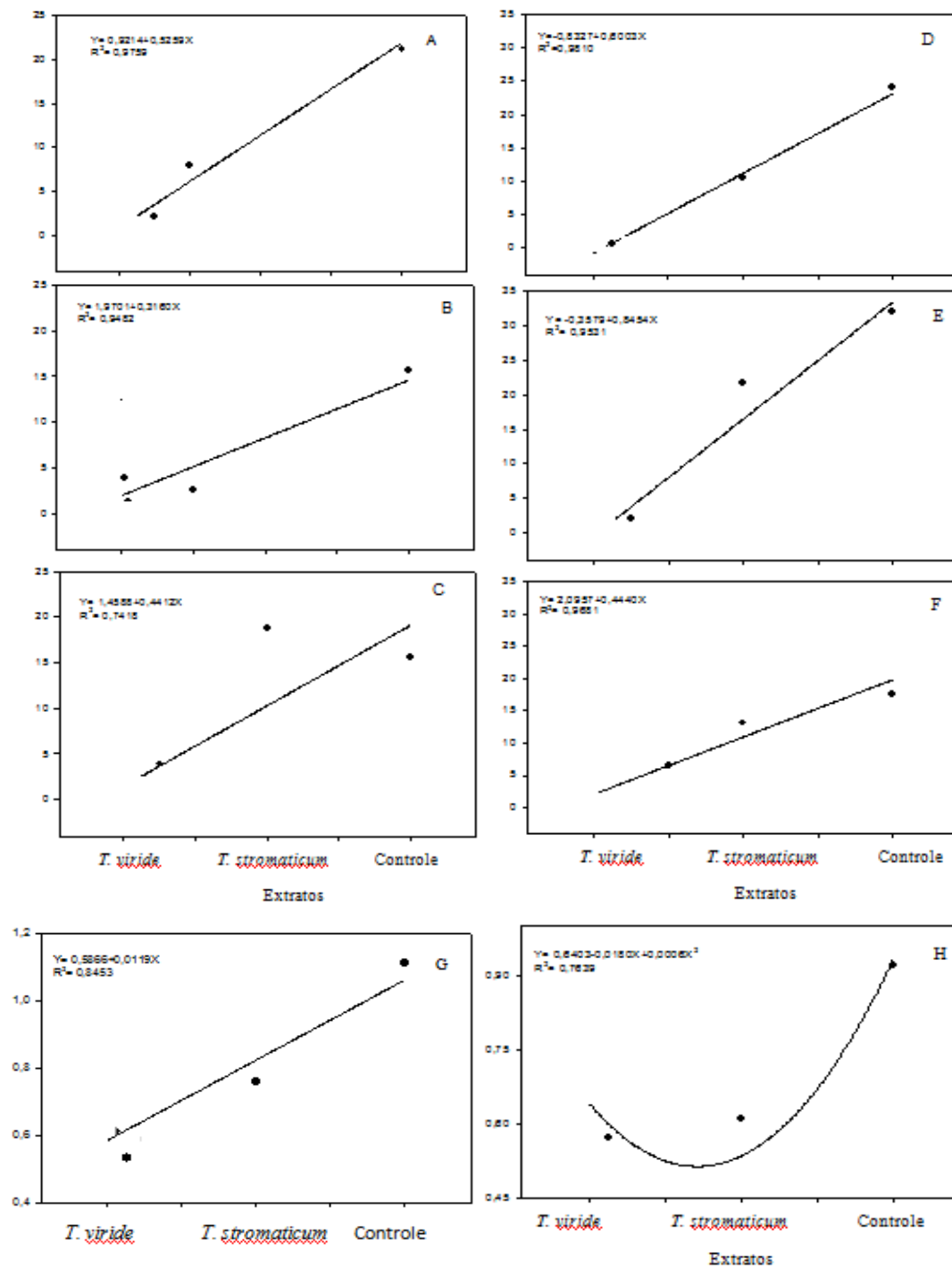


Figura 2: Atividade antimicrobiana através do halo de inibição, dos extratos de *Trichoderma viride* e *Trichoderma stromaticum* (A) *Candida cruzei* (B) *Candida albicans*; (C) *Colletotrichum musae* (D) *Saprolegnia*; (E) *Escherichia coli*; (F) *Enterobacter cloacae* (G) *Aeromonas hydrophila* (H) *Colletotrichum musae*.

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (MIC) de extrato diclorometânico de *Trichoderma viride* para bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

MIC (em %)		
Microrganismo	Extrato <i>T. viride</i>	Extrato <i>T. stromaticum</i>
<i>Escherichia coli</i>	25	3,125
<i>Enterobacter cloacae</i>	12,5	3,125
<i>Aeromonas hydrophila</i>	12,5	6,25
<i>Candida albicans</i>	6,25	50
<i>Candida kruzei</i>	25	3,125
<i>Colletotricum musae</i>	25	50
<i>Saprolegnia</i>	50	50

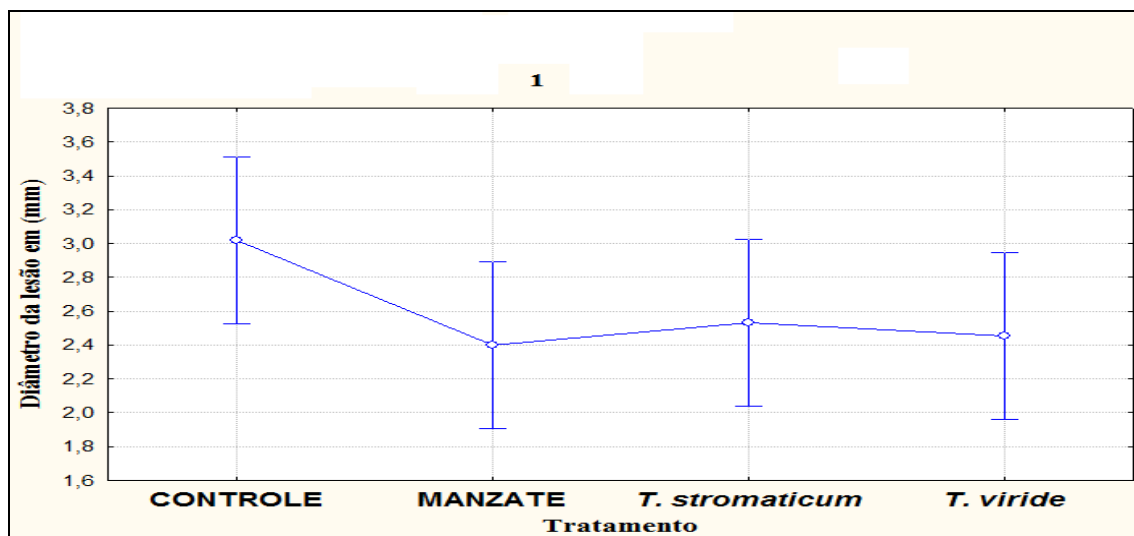


Figura 3: Lesões em bananas orgânicas (mm) no tratamento com os extratos de *Trichoderma viride* e *Trichoderma stromaticum*, fungicida comercial Manzate e Controle.

ANEXO

ANEXO 1 – NORMAS DA REVISTA CERES

Diretrizes para Autores

Formatação

O texto deve ser digitado em Microsoft Word (versão 97-2003), justificado, em espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12.

O formato da página deverá ser A4, com margens de 3 cm.

As páginas devem apresentar linhas numeradas sequencialmente (a numeração é feita da seguinte forma: layout da página / número de linhas / contínuo).

Paginação

Os artigos devem ter, no máximo, 25 páginas, incluindo-se as referências, figuras e tabelas.

As comunicações devem ter, no máximo, 15 páginas, incluindo-se as referências, figuras e tabelas.

Idioma

A Revista Ceres aceita a submissão e publica artigos nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola. A partir de 2016, independentemente do idioma em que o artigo tenha sido submetido, pelo menos 50% dos artigos serão publicados em inglês, cabendo à Comissão Editorial decidir quais artigos de um fascículo deverão ser publicados nessa língua. A Comissão Editorial utilizará como critérios decisórios a abrangência global do tema abordado e o aumento da visibilidade da ciência brasileira. Uma vez escolhidos os artigos que serão publicados em inglês, caso eles tenham sido submetidos em língua diferente, caberá aos autores providenciar sua tradução e enviar o texto traduzido para a revista, acompanhado do certificado de tradução emitido pelo responsável, num prazo máximo de um mês.

Serão aceitas traduções/versões das seguintes pessoas físicas ou jurídicas:

Pessoas físicas:

(Português/Inglês – Inglês/Português)

Evelyn Jardim de Oliveira - evelyn_jardim@yahoo.com.br

Leonardo Francisco Ferreira - leonardo.fferreira@hotmail.com

(Português/Espanhol – Espanhol/Português)

Leidy Yibeth Deantonio Florido - leidydeflo@gmail.com

Pessoas jurídicas:

www.journalexperts.com

www.wsr-ops.com

www.journaleditorsusa.com

<http://www.queensenglishediting.com/>

www.canalpage.com

<http://www.editage.com.br/manuscriptediting/index.html>

<http://webshop.elsevier.com/languageservices/>

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

<http://www.stta.com.br/servicos.php>

<http://americanmanuscripteditors.com/>

Autoria

Os artigos e comunicações devem ter, no máximo, seis autores.

Seções de Artigos e Comunicações

Título

Deverá ter no máximo 20 palavras, centralizadas e em negrito. Apenas a primeira palavra com a letra inicial em maiúscula e as demais em minúscula, exceto em casos pertinentes (p. ex., nomes científicos; *Phaseolus vulgaris*). Se necessário, introduzir nota de rodapé, ao seu final, usando algarismo arábico sobrescrito. (veja o item rodapé)

Nomes dos autores

Os nomes dos autores devem ser listados, sem abreviações, em sequência, separados por vírgula, centralizados abaixo do título, aplicando-se itálico, utilizando-se letras maiúsculas/ minúsculas. Para cada autor deverá ser colocada uma nota de rodapé. O autor correspondente será sempre aquele que submeter o artigo.

Exemplo:

Maria Célia da Silva*2, Antônio José da Silva3, Ana Maria da Silva4, Simone da Silva
Fonseca5

Rodapé

A primeira nota deve fornecer informações sobre o trabalho (se foi extraído de tese, dissertação, etc., e fonte financiadora) e as demais, informações sobre a afiliação de cada um dos autores, obedecendo à seguinte ordem: Instituição, departamento (quando houver), cidade, estado, país e e-mail. Não utilizar abreviações para nenhuma informação do rodapé.

Exemplo:

1Este trabalho é parte da dissertação de mestrado da primeira autora.

2 Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa, Minas
Gerais, Brasil. maria@ufv.br

3 Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa, Minas
Gerais, Brasil. antonio@ufv.br

4 Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa, Minas
Gerais, Brasil. ana@ufv.br

5 Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa, Minas
Gerais, Brasil. simone@ufv.br

*Autora para correspondência: maria@ufv.br

Resumo

A palavra "RESUMO" deve ser escrita em letras maiúsculas, alinhada à esquerda e ter aplicação de negrito. Essa seção deve conter no máximo 250 palavras e ter apenas um parágrafo. O texto do resumo deve conter, em linhas gerais, a hipótese, os objetivos, material e métodos utilizados, resultados expressivos alcançados e a conclusão. O resumo deve ser iniciado na linha subsequente ao título dessa seção.

Palavras-chave

As palavras-chave devem ter um número mínimo de três e máximo de seis palavras e devem ser citadas em parágrafo subsequente ao resumo. Devem ser grafadas com inicial minúscula (exceto os nomes científicos) e separadas por ponto e vírgula, preferencialmente sem repetir palavras contidas no título do trabalho.

Abstract /Resumen

A palavra "ABSTRACT" deve ser escrita em letras maiúsculas, alinhada à esquerda e ter aplicação de negrito. Na linha subsequente, deve-se inserir o título (em inglês ou espanhol) centralizado e com aplicação de negrito. O Abstract e o Resumen devem corresponder ao resumo.

Key words / Palabras clave

As "Key words" devem ser citadas em parágrafo subsequente ao "Abstract" e ser separadas por ponto e vírgula. Devem corresponder às palavras-chave.

Introdução

O título dessa seção, "INTRODUÇÃO", deve ser escrito em letras maiúsculas, alinhado à esquerda. A introdução deve ater-se ao problema do trabalho em pauta, situando o leitor quanto à sua importância, hipótese da pesquisa e os objetivos, estando estes últimos claramente expressos ao final da introdução.

Material e Métodos

O título dessa seção, "MATERIAL E MÉTODOS", deve ser escrito em letras maiúsculas, alinhado à esquerda. A seção "Material e Métodos" deve ser redigida com detalhes suficientes para que o trabalho possa ser repetido. A Revista CERES requer que estejam especificados no artigo os procedimentos estatísticos, incluindo: o delineamento utilizado, o número de repetições e a técnica estatística empregada. Quando não houver delineamento, o artigo deve descrever claramente como foi feita a condução da pesquisa, e qual a técnica estatística utilizada para a análise dos dados. Quando os tratamentos se constituírem de fatores quantitativos com três ou mais níveis, as variáveis de resposta devem ser submetidas à análise de regressão. Se for de interesse comparar os níveis com o padrão ou testemunha, o teste adotado deve ser o Dunnett. Casos excepcionais serão avaliados pela Comissão Editorial. Trabalhos envolvendo experimentação animal ou humana devem explicitar no primeiro parágrafo o protocolo de aprovação do Comitê e Ética em Experimentação Animal ou Comitê de Ética em

Pesquisa com Seres Humanos

Resultados e Discussão

O título da seção, "RESULTADOS E DISCUSSÃO", deve ser escrito em letras maiúsculas, alinhado à esquerda. O texto deve ser claro e conciso, apoiado na literatura pertinente. Resultados e Discussão são seções que podem vir juntas ou separadas.

Obs: As seções Material e Métodos e Resultados e Discussão poderão conter subseções, indicadas por subtítulos escritos em itálico e negrito, iniciados por letra maiúscula e centralizados.

Conclusões

O título da seção "CONCLUSÕES" deve ser escrito em letras maiúsculas, alinhado à esquerda. As conclusões devem ser concisas e derivadas dos dados apresentados e discutidos.

Referências

O título da seção "REFERÊNCIAS" deve ser escrito em letras maiúsculas, alinhado à esquerda. As referências devem ser listadas por ordem alfabética. Seguem os exemplos:

a) Artigos de periódicos:

Anselme KL (2000) Review: Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21:667-681.

Davies JE & Baldan N (1997) Scan electron microscopy of the bone-bioactive implant interface. *Journal of Biomedical Material Research*, 36:429-440.

Conz MB, Granjeiro JM & Soares GA (2005) Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications on bone graft. *Journal of Applied Oral Sciences*, 13:136-140.

b) Livros:

Orefice RL, Pereira MM & Mansur HS (2006) *Biomateriais: Fundamentos e aplicações*. 3ª ed. Rio de Janeiro, Cultura Médica. 538p.

c) Capítulos de livros:

Costa EF, Brito RAL & Silva EM (1994) Cálculos e manejo da quimigação nos sistemas pressurizados. In: Costa EF, Vieira RF & Viana PA (Eds.) *Quimigação: Aplicação de produtos químicos e biológicos via irrigação*. Brasília, EMBRAPA. p.183-200.

d) Trabalhos em anais de congresso:

Junqueira Netto A, Sedyama T, Sedyama CS & Rezende PM (1982) Análise de adaptabilidade e estabilidade de dezesseis cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em seis municípios do sul de Minas Gerais. In: 1ª Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão, Goiânia. Anais, EMBRAPA/CNPAP. p.47-48.

e) Teses e dissertações:

Wutke EB (1998) Desempenho do feijoeiro em rotação com milho e adubos verdes. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba. 146p.

f) CD-ROM:

França MHC & Omar JHDH (2004) Estimativa da função de produção do arroz no estado do Rio Grande do Sul: 1969 a 1999. In: 2º Encontro de Economia Gaúcha, Porto Alegre. Anais, FEE. CD-ROM.

g) Internet:

Darolt MR & Skora Neto F (2002) Sistema de plantio direto em agricultura orgânica.

Disponível em:

<http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/agroecologia/publicacoes/plantorganico2002.pdf>. Acessado em: 23 de abril de 2009.

h) Boletim técnico:

Bastos DC, Scarpate Filho JA, Fatinansi JC, Pio R & Spósito MB (2004) A cultura da lichia. Piracicaba, DIBD/ESALQ. 23p. (Boletim técnico, 26).

i) Programas estatísticos:

R development core team (2010) R: A Language and environment for statistical computing. Vienna, R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: . Acessado em: 01 de janeiro de 2012.

SAS Institute Inc. (2002) Statistical Analysis System user's guide. Version 9.0. Cary, Statistical Analysis System Institute. 513p.

Universidade Federal de Viçosa (2007) SAEG: Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas. Versão 9.1. Viçosa, Fundação Arthur Bernardes. CD-ROM.

j) Legislação:

Brasil (2000) Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta.

DOU, 10/01/2000, Seção 1, p.259.

Brasil (2001) Resolução RDC n. 12, de 02 janeiro de 2001. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. DOU, 02/01/2001, Seção 1,

p.174.

No texto, citar as referências nos formatos: (Autor, Ano), (Autor & Autor, Ano), (Autor et al., Ano) ou (Silva, 1999; Arariki & Borges, 2003; Santos et al., 2007), sempre em ordem cronológica ascendente. A referência deve ser citada ao final de um período que expresse uma idéia completa. Quando os nomes dos autores forem parte integrante do texto, menciona-se a data da publicação citada entre parênteses, logo após o nome do autor, conforme exemplos: Fontes (1999), Borges & Loreno (2007), Batista et al.

(2005).

Citação de citação

Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Entretanto, nem sempre é possível. Nesse caso, pode-se reproduzir informação já citada por outros autores. Pode-se adotar o seguinte procedimento: no texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado

por e o sobrenome do autor do documento consultado com o ano de publicação; na listagem das referências deve-se incluir a referência completa da fonte consultada.

Comunicação pessoal

Não faz parte da lista de referências, sendo colocada apenas em nota de rodapé. Coloca-se o sobrenome do autor seguido da expressão “comunicação pessoal”, a data da comunicação, nome, estado e país da Instituição ao qual o autor é vinculado.

Financiamento e apoio

Os autores devem informar se receberam financiamento ou apoio de instituições de incentivo à pesquisa.

Normas para figuras e tabelas

As figuras e tabelas devem ser posicionadas após as referências, uma em cada página, e ser numeradas com algarismos arábicos, ficando a legenda posicionada abaixo nas figuras e acima nas tabelas.

Figuras e tabelas não devem repetir os mesmos dados. Figuras submetidas em formato eletrônico devem apresentar resolução mínima de 300 dpi, em formato JPG. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) de onde foi extraída.

A referência bibliográfica completa relativa à fonte da ilustração deve figurar na seção Referências. As despesas de impressão de ilustrações coloridas correrão por conta dos autores.

Tabela

O termo refere-se ao conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Deve ser construída apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tabela.

Figura

O termo refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. Os desenhos, gráficos, etc. devem ser bem nítidos. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Figura.

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE E CESSÃO DOS DIREITOS AUTORAIS

Esta declaração é de envio obrigatório e deverá ser anexada em “documentos suplementares”. Ela deverá ser impressa, assinada por todos os autores e digitalizada.

Caso não seja possível enviar um único documento com as assinaturas de todos os autores, poderá ser enviada uma declaração para cada autor. Assinaturas eletrônicas não serão aceitas. Modelo da declaração.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista;

O arquivo da submissão está em formato Microsoft Word, versão 97-2003;

URLs para as referências foram informadas quando possível.

O texto está em espaço duplo e a fonte é Times New Roman, tamanho 12;

O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na página Sobre a Revista.

Tabelas, figuras e equações estão em formato JPG, 300dpi, e inseridas após as Referências, uma em cada página;

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ISSN: 2177-3491