Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Correlação entre a qualidade do caldo de cana-de-açúcar e infecção por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* agente causal do raquitismo das soqueiras

Nathalia Torres Corrêa Magri

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2020

Nathalia Torres Corrêa Magri
Tecnóloga em Biocombustíveis

Correlação entre a qualidade do caldo de cana-de-açúcar e infecção por *Leifsonia xyli*
subsp. *xyli* agente causal do raquitismo das soqueiras
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **CLAUDIO LIMA DE AGUIAR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Magri, Nathalia Torres Corrêa

Correlação entre a qualidade do caldo de cana-de-açúcar e infecção por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* agente causal do raquitismo das soqueiras / Nathalia Torres Corrêa Magri. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.
128 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Saccharum officinarum* 2. Bactéria endofítica 3. Sacarose 4. Compostos fenólicos I. Título

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro concedido nos primeiros meses do doutorado - Código de Financiamento 001 - e pela bolsa concedida pelo Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) – Código de Financiamento 88881.188971/2018-01.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido durante o doutorado – Código de Financiamento 142026/2017-4.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Claudio pela orientação ao longo dos anos.

Aos meus colegas do laboratório: Juliana, Lorenz, Graziela, Felipe, Gislene, Laís, Mariana, Marina, Roberta, Nayara, Bruna, Ana, Guilherme, João, Rafael, Gabriel e Anne, por toda a ajuda nos plantios, coletas, análises, apresentações e pelo companheirismo ao longo dos anos, sem vocês esse trabalho não seria possível.

Ao Prof. Aranha pela ajuda durante o desenvolvimento do projeto e a disponibilidade de espaço para montagem dos experimentos e análises.

Aos colegas do Laboratório LGM: Mariana, Rafa, Ferchu, Lilian, Camila, Marie, Fernando e Vanessa, por toda a ajuda durante o desenvolvimento do projeto e principalmente pelo acolhimento que recebi no grupo.

Aos técnicos do Departamento LAN III, Pedrinho, Sylvino e Rose pela ajuda no processamento das canas.

Ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela infraestrutura oferecida do campo experimental para a montagem dos experimentos e ao técnico Pedro Arthuso pela ajuda com a manutenção das canas.

Ao Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pela doação de canas sintomáticas e não sintomáticas de raquitismo das soqueiras.

Ao Prof. Heredia, a Profª. Dolores e todo o grupo de *Color y Calidad de Alimentos* da *Universidad de Sevilla* por me receber tão bem durante o tempo que estive na Espanha, certamente esses meses longe de casa foram mais fáceis graças a toda a ajuda, compreensão e carisma de vocês.

Ao Prof. Marcos Kamogawa e ao Marcos Brasil pela disponibilidade do laboratório e do uso de equipamentos para as análises de pol.

A Prof. Simone e todo o seu grupo de pesquisa pelo acolhimento na reta final desse doutorado.

As pessoas inesquecíveis que tive o prazer de conhecer em Sevilla, em especial a minha querida Madá por me acolher e ter sido uma mãe para mim.

Ao meu marido Lucas, o amor da minha vida e meu melhor amigo. Muito obrigada por ter sido meu apoio ao longo desses anos, por ter suportado tantos desafios comigo, se alegrado com minhas vitórias, apoiado as minhas escolhas e ajudado tanto para o desenvolvimento desse doutorado.

E aos meus pais e minha família por todo o apoio e carinho ao longo dos anos.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO	12
REFERÊNCIAS	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. CANA-DE-AÇÚCAR	17
2.2. RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS	18
2.3. COMPOSTOS FENÓLICOS	21
2.4. PRODUÇÃO DE AÇÚCAR	24
REFERÊNCIAS	27
3. EFEITO DO RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS NA QUALIDADE E CARACTERÍSTICA DO CALDO DE CANA-PLANTA	33
RESUMO	33
ABSTRACT	34
3.1. INTRODUÇÃO	34
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.4. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
4. EFEITO DO RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS NA QUALIDADE E CARACTERÍSTICAS DO CALDO DE CANA-SOCA	71
RESUMO	71
ABSTRACT	71
4.1. INTRODUÇÃO	72
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	73
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.4. CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	90
5. AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS EM VARIEDADE SUSCETVEL DE CANA-PLANTA CULTIVADA EM CAMPO	97
RESUMO	97
ABSTRACT	97
5.1. INTRODUÇÃO	98
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	100
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	111
5.4. CONCLUSÃO	120
REFERÊNCIAS	121

RESUMO

Correlação entre a qualidade do caldo de cana-de-açúcar e infecção por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* agente causal do raquitismo das soqueiras

A incidência de pragas e doenças no canavial pode influenciar na qualidade da cana-de-açúcar e na produção do açúcar. O raquitismo das soqueiras, causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), é uma das principais doenças que acomete a cultura da cana-de-açúcar. É de difícil diagnose e os danos podem ser agravados em situações de estresse hídrico ou na presença de outras doenças. Em muitos casos, doenças e pragas na cana-de-açúcar tendem a reduzir os teores de sacarose, aumentar as concentrações de açúcares redutores (glicose e frutose) e de compostos fenólicos, devido a ativação de mecanismos de defesa. Esses fatores podem dificultar o processo de produção do açúcar. Trabalhos que relacionam a qualidade do caldo de cana-de-açúcar com o raquitismo das soqueiras ainda são poucos difundidos na literatura. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre o raquitismo das soqueiras e a qualidade do caldo de cana-de-açúcar através de três experimentos. No primeiro experimento foram avaliadas as variedades SP80-3280 (resistência moderada) e CB49-260 (suscetível) de cana-planta. No segundo experimento foi utilizada cana-soca da variedade CB49-260 e no terceiro experimento foram investigadas mudas de cana-planta já infectadas da variedade CB49-260. As amostras de caldo de cana-de-açúcar foram avaliadas quanto a quantidade bacteriana, análises tecnológicas, físico-químicas, cromaticidade através das coordenadas do espaço de cor CIELAB, quantificação de açúcares e de compostos fenólicos por cromatografia líquida e atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase, além disso também foi avaliado o teor de lignina do bagaço residual da extração do caldo. No primeiro experimento a doença não reduziu a qualidade do caldo de cana-planta, uma vez que amostras inoculadas apresentaram maiores valores para brix%caldo, pol%caldo, pureza e açúcares totais recuperáveis, além de maior luminosidade e croma, indicando que eram mais claras e brilhantes do que os controles. Cinco classes de compostos fenólicos puderam ser quantificadas nas amostras, sendo que a variedade CB49-260 apresentou as maiores concentrações de flavonas, flavonóis e flavanonas, o que pode ter influenciado na classificação das mesmas amostras no espaço de cor CIELAB, próximo do amarelo (90°). Já a variedade SP80-3280, apresentou as maiores concentrações de ácidos benzoico e hidroxicinâmico, os quais estão envolvidos em processos de defesa das plantas. A menor concentração de açúcares redutores em amostras inoculadas de CB49-260 pode estar associada ao consumo de glicose pela Lxx para o seu crescimento. No segundo experimento a doença promoveu uma redução na qualidade do caldo de cana-de-açúcar, uma vez que amostras com altos títulos de Lxx apresentaram maiores valores para açúcares redutores%cana, fibra%cana, turbidez, fenólicos totais, glicose e frutose. A maior concentração de açúcares redutores contribuiu para a redução da pureza do caldo o que pode interferir no processo de recuperação do açúcar. A concentração mais baixa de glicose, comparada com a frutose, nas amostras com maior título bacteriano pode ter ocorrido devido ao consumo desse açúcar como fonte de carbono, para o crescimento bacteriano. No terceiro experimento a doença não reduziu a qualidade da cana-planta, uma vez que, amostras com os maiores títulos de Lxx apresentaram valores estatisticamente maiores para pol%caldo, pureza e açúcares totais recuperáveis e valores estatisticamente menores para açúcares redutores%cana, pH, cor ICUMSA, turbidez, fenólicos totais e flavonóides totais. A atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase e a porcentagem de lignina total do bagaço não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, mostrando que a quantidade de bactéria não foi suficiente para influenciar esses parâmetros.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum*, Bactéria endofítica, Sacarose, Compostos fenólicos

ABSTRACT

Correlation between the quality of sugarcane juice and infection by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* causal agent of ratoon stunting disease

The incidence of pests and diseases in the cane field can influence the quality of the sugarcane and the production of sugar. Ratoon stunting disease, caused by the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), is one of the main diseases that affects the culture of sugarcane. It is difficult to diagnose and the damage can be aggravated in situations of water stress or in the presence of other diseases. In many cases, diseases and pests in sugarcane tend to reduce sucrose levels, increase the concentrations of reducing sugars (glucose and fructose) and phenolic compounds, due to the activation of defense mechanisms. These factors can hinder the sugar production process. Studies that relate the quality of the sugarcane juice with the ratoon stunting disease are still few in the literature. Therefore, the objective of this work was to evaluate the relationship between RSD and the quality of the sugarcane juice through three experiments. In the first experiment, the varieties SP80-3280 (moderate resistance) and CB49-260 (susceptible) of plant cane were evaluated. In the second experiment, ratoon cane of the CB49-260 variety was used and in the third experiment, sugarcane plant cane seedlings of CB49-260 variety, already infected, were investigated. Sugarcane juice samples were evaluated for bacterial quantity, technological, physical-chemical analysis, chromaticity using the CIELAB color space, quantification of sugars and phenolic compounds by liquid chromatography and enzymatic activity of peroxidase and polyphenoloxidase, in addition the lignin content of the residual bagasse from the juice extraction was also evaluated. In the first experiment, the disease did not reduce the quality of the plant cane juice, since inoculated samples showed higher values for brix%juice, pol%juice, purity and total recoverable sugars, in addition to greater brightness and chroma, indicating that they were more clearer and brighter than the controls. Five classes of phenolic compounds could be quantified in the samples, with the CB49-260 variety showing the highest concentrations of flavones, flavonols and flavanones, which may have influenced the classification of the same samples in the CIELAB color space, close to yellow (90°). The SP80-3280 variety, on the other hand, had the highest concentrations of benzoic and hydroxycinnamic acids, which are involved in plant defense processes. The lower concentration of reducing sugars in inoculated samples of CB49-260 may be associated with the consumption of glucose by the Lxx for its growth. In the second experiment, the disease reduced the quality of the sugarcane juice, since samples with high Lxx titers showed higher values for reducing sugars%sugarcane, fiber%cane, turbidity, total phenolics, glucose and fructose. The higher concentration of reducing sugars contributed to reducing the purity of the juice, which can interfere with the sugar recovery process. The lower concentration of glucose, compared to fructose, in samples with a higher bacterial titer may have occurred due to the consumption of this sugar as a carbon source for bacterial growth. In the third experiment, the disease did not reduce the quality of plant cane, since samples with the highest Lxx titers showed statistically higher values for pol%juice, purity and total recoverable sugars and statistically lower values for reducing sugars%sugarcane, pH, ICUMSA color, turbidity, total phenolics and total flavonoids. The enzymatic activity of peroxidase and polyphenoloxidase and the percentage of total bagasse lignin showed no statistical difference between treatments, showing that the amount of bacteria was not sufficient to influence these parameters.

Keywords: *Saccharum officinarum*, Endophytic bacteria, Sucrose, Phenolic compounds

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota de produção de alguns compostos fenólicos em plantas a partir da fenilalanina amônia-liase (PAL) (Adaptado Guidi et al. (2004)).	23
Figura 2. Plantio e desenvolvimento das gemas das variedades SP80-3280 (a) e CB49-260 (b), em agosto/16 (Exp.1) antes do transplante para vasos e inoculação das plantas.	37
Figura 3. Croqui dos Experimentos 1 e 2 conduzidos em casa de vegetação.	38
Figura 4. Colmo de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 inoculada com solução tampão PBS + <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Exp.1): (a) desenvolvimento da planta minutos após a inoculação; e (b) 48h após a inoculação.	39
Figura 5. Equipamentos utilizados para a extração do caldo de cana-de-açúcar: (a) Desfibrador Mod. A t 56 a (Arno S.A, Brasil); (b) prensa hidráulica (Codistil, Brasil).	40
Figura 6. Coordenadas do espaço de cor CIELAB (L^* , a^* , b^*). Fonte: Konica Minolta	47
Figura 7. Plano CIELAB (a^*b^*) para amostras de caldo de cana-planta das variedades CB49-260 e SP80-3280 inoculadas com <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (I) e controle (C).	58
Figura 8. Plano CIELAB (a^*b^*) para amostras de caldo de cana-planta das variedades CB9-260 inoculadas com <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (I) e controle (C).	58
Figura 9. Plano CIELAB (a^*b^*) para amostras de caldo de cana-planta das variedades SP80-3280 inoculadas com <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (I) e controle (C).	59
Figura 10. Análise discriminante das variedades CB49-260 e SP80-3280 em função dos compostos fenólicos quantificados por UHPLC.	62
Figura 11. Colmos despontados de cana-de-açúcar da variedade CB49-260, com e sem sintomas de RSD. A esquerda das imagens colmos “com sintomas aparentes da doença” e a direita colmos “sem sintomas aparentes da doença”.	74
Figura 12. Equipamentos utilizados para a extração do caldo de cana-de-açúcar: (a) Desfibrador Mod. A t 56 a (Arno S.A, Brasil); (b) prensa hidráulica (Codistil, Brasil).	75
Figura 13. Matriz da variedade CB49-260 cultivada no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ).	101
Figura 14. Gemas da variedade CB49-260 provenientes da matriz e cultivadas em casa de vegetação.	101
Figura 15. Croqui do experimento conduzido em campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ).	102
Figura 16. Plantas da variedade CB49-260 cultivadas em campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ). Estacas brancas representam a fileira com canas assintomáticas (#CBNI) e as estacas pretas representam as fileiras de canas sintomáticas (#CBI).	102
Figura 17. Equipamentos utilizados para a extração do caldo de cana-de-açúcar: (a) Desfibrador Mod. A t 56 a (Arno S.A, Brasil); (b) prensa hidráulica (Codistil, Brasil).	103

Figura 18. Concentração de DNA de Lxx ($\times 10^6$ de células bacterianas/ μL de caldo de cana) na bainha de folha +1 de cana-de-açúcar via qPCR para a variedade CB49-260 em três tempos de coleta: 15, 180 e 365 dias após o plantio em campo. As barras representam o erro padrão da média. Médias dentro de cada tratamento, seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

..... 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Correlação entre quantidade de DNA por reação e número de células de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	41
Tabela 2. Concentração de título bacteriano ($\times 10^6$ de células bacterianas/ μL de caldo de cana) para <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> em amostras de caldo de cana-planta, das variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária) com 180 DAI	48
Tabela 3. Valores de brix%caldo, pol%caldo e pureza (%), determinados segundo o Manual Consecana, para caldo de cana-planta, das variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária) com 180 DAI	50
Tabela 4. Valores de ARC (%), fibra%cana e ATR (kg/ton), determinados segundo o Manual Consecana, para caldo de cana-planta, das variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária) com 180 DAI	51
Tabela 5. Valores de cor ICUMSA (U.I.) e turbidez (NTU) para caldo de cana-planta, das variedades CB49-260 (suscetível) e sSP80-3280 (resistência intermediária) com 180 DAI.....	53
Tabela 6. Valores de fenólicos totais (g L^{-1}) e flavonóides totais (g L^{-1}) para caldo de cana-planta, das variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária) com 180 DAI.....	54
Tabela 7. Coordenadas de cores CIELAB (e desvio padrão) obtidas para caldo de cana-planta das variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária) e seus tratamentos (inoculado e controle)	56
Tabela 8. Valores de R^2 obtidos a partir de modelos de regressão simples, para o estudo da relação entre os tratamentos, inoculado com <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (I) e controle (C), e as coordenadas angulares (L^* , h_{ab} , C^*_{ab}), para as variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária) [†]	57
Tabela 9. Concentração (mg L^{-1}), desvio padrão e R^2 de compostos fenólicos quantificados em amostras de caldo de cana-planta das variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária), para os tratamentos inoculado com <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (I) e controle (C).....	60
Tabela 10. Correlação entre quantidade de DNA por reação e número de células de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	76
Tabela 11. Concentração de título bacteriano ($\times 10^6$ de células bacterianas/ μL de caldo de cana) de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> em amostras de caldo de cana-soca da variedade CB49-260.....	82
Tabela 12. Valores de brix%caldo, pol%caldo e pureza (%), determinados segundo o Manual Consecana, para caldo de cana-soca, com alto e baixo título de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> , da variedade CB49-260	83
Tabela 13. Valores de ARC (%), fibra%cana e ATR (kg/ton), determinados segundo o Manual Consecana, para caldo de cana-soca, com alto e baixo título de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> , da variedade CB49-260	84
Tabela 14. Valores de pH, turbidez (NTU) e cor ICUMSA (U.I.) para caldo de cana-soca, com alto e baixo título de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> , da variedade CB49-260.....	85

Tabela 15. Valores de fenólicos totais (g L^{-1}) e flavonóides totais (g L^{-1}) para caldo de cana-soca, com alto e baixo título de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> , da variedade CB49-260 .	86
Tabela 16. Valores para sacarose (mg mL^{-1}), frutose (mg mL^{-1}) e glicose (mg mL^{-1}) para caldo de cana-soca, com alto e baixo título de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> , da variedade CB49-260	88
Tabela 17. Correlação entre quantidade de dna por reação e número de células de <i>leifsonia xyli</i> subsp. <i>Xyli</i>	105
Tabela 18. Valores de brix%caldo, pol%caldo e pureza (%), determinados segundo o Manual Consecana, para caldo de cana-planta com alto e baixo título de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> , da variedade CB49-260.....	113
Tabela 19. Valores de ARC (%), fibra%cana e ATR (kg/ton), determinados segundo o Manual Consecana, para caldo de cana-planta com alto e baixo título de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> , da variedade CB49-260.....	114
Tabela 20. Valores de pH, cor ICUMSA (U.I.) e turbidez (NTU), para caldo de cana-planta com alto e baixo título de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> , da variedade CB49-260	115
Tabela 21. Valores de fenólicos totais (g L^{-1}) e flavonóides totais (g L^{-1}), para caldo de cana-planta com alto e baixo título de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> , da variedade CB49-260	117
Tabela 22. Valores de atividade da peroxidase (U mL^{-1}) e polifenoloxidase (U mL^{-1}) para caldo de cana-planta com alto e baixo título de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> , da variedade CB49-260	118
Tabela 23. Valores de lignina total do pbu de cana-planta com alto e baixo título de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> , da variedade CB49-260.....	119

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores de cana-de-açúcar no mundo (USDA, 2019). Para a safra 2020/21 a perspectiva é de uma produção de aproximadamente 630,7 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, enquanto que a produção do açúcar será em torno de 35,3 milhões de toneladas (CONAB, 2020). O mercado externo é o principal destino do açúcar brasileiro, cerca de 70% de toda a produção brasileira acaba sendo destinada ao exterior (GIRARDI, 2019). Durante a safra 2019/20 o país exportou 18,9 milhões de toneladas de açúcar, o que equivaleu aproximadamente a R\$ 5,8 bilhões (CONAB, 2019). Outro destino do açúcar brasileiro é o consumo doméstico, o Brasil é o quarto país com maior consumo de açúcar (12 milhões de toneladas/ano) de acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS), ficando atrás da Índia, União Europeia e China (BASSETTE, 2019; MDS, 2016). O consumo de açúcar por parte da população brasileira ocorre através da ingestão de alimentos que possuem naturalmente o açúcar em sua composição, como leite (lactose), frutas e vegetais (frutose) e/ou através do consumo de alimentos e bebidas industrializados nos quais são adicionados açúcares e xaropes em sua formulação durante o processamento. Devido a maior disponibilidade desses produtos industrializados no mercado e seus baixos custos, o consumo dos chamados açúcares adicionados (açúcares e xaropes adicionados aos produtos) tem aumentado no Brasil ao longo dos anos (LEVY et al., 2012; SCAPIN et al., 2018; SILVA; DA CRUZ, 2016).

Fatores abióticos (adubação, irrigação, clima, solo, variedade, entre outros) e bióticos (doenças, pragas, entre outros) podem interferir no desenvolvimento da cana-de-açúcar o que consequentemente pode afetar no rendimento e na qualidade do açúcar a ser produzido (AMORIM et al., 2004; CLARKE; LEGENDRE, 1999; DOJAS; BATISTA; MARQUES, 2009; LEGENDRE et al., 1998). Um dos maiores obstáculos para o Brasil obter uma produção ainda maior de cana-de-açúcar é a incidência de pragas e doenças na cultura, ocasionando elevados danos econômicos (SANTOS et al., 2019). Há mais de 200 doenças que acometem a cultura de cana-de-açúcar, das quais 60 já foram relatadas no Brasil, sendo que nove delas são consideradas de maiores importâncias pelo potencial de danos que causam, como o raquitismo das soqueiras (MENTEN, 2017; ROSSETTO; SANTIAGO, 2006). O raquitismo das soqueiras (RSD, do inglês *Ratoon Stunting Disease*) é uma doença causada por uma bactéria, a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), e pode causar prejuízos de 5 a 30% na produtividade e infeccionar até 100% do canavial (ROSSETTO; SANTIAGO, 2006). A doença é associada a um crescimento irregular da planta, deixando os colmos finos e entrenós encurtados (TOKESHI; RAGO, 2016). Muitas pesquisas têm sido feitas ao longo dos anos tanto a nível molecular, indicando interferências no metabolismo da planta

devido a presença da bactéria (CIA et al., 2018; ZHANG et al., 2016a, 2016b; ZHU et al., 2018), quanto a nível de produtividade, apontando que a doença reduz a biomassa e interfere no rendimento de açúcar (BAILEY; BECHET, 1995; COMSTOCK, 2008; MCFARLANE, 2002; ZEKARIAS et al., 2012; ZVOUTETE, 2004), contudo estudos mais detalhados sobre o impacto da doença nas características do caldo de cana-de-açúcar, objetivando a produção do açúcar, ainda são pouco divulgados.

Desta forma, visando entender e avaliar quais os são impactos que o raquitismo das soqueiras pode causar na qualidade do caldo de cana-de-açúcar e, conseqüentemente, interferir na produção de açúcar, os objetivos desse trabalho de doutorado foram:

- a) Quantificar e identificar a presença da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* através da técnica de PCR em tempo real (qPCR), de forma a validar as inoculações realizadas e classificar os tratamentos discutidos ao longo do trabalho;
- b) Avaliar a qualidade dos caldos de cana-de-açúcar através de análises tecnológicas e físico-químicas;
- c) Avaliar os parâmetros de cor dos caldos através do espaço de cor CIELAB;
- d) Quantificar os compostos fenólicos presentes nos caldos por cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC);
- e) Quantificar os teores de açúcares presente nos caldos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- f) Avaliar a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase nos caldos de cana-de-açúcar devido a presença do microrganismo;
- g) Quantificar as frações de lignina solúvel e insolúvel, do bagaço residual da extração dos caldos.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V. et al. Qualidade da cana-de-açúcar e seu impacto na indústria. In: RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C. (Eds.). **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. 1. ed. Piracicaba: Barros e Marques Editoração Eletrônica, 2004. p. 185–193.
- BAILEY, R.; BECHET, G. The effect of ratoon stunting disease on the yield of some South African sugarcane varieties under irrigated and rainfed conditions. **Proceedings of The South African Sugar Technologists' Association**, June, p. 74–78, 1995.
- BASSETTE, F. **Está na hora de tratarmos o açúcar como lidamos com o tabaco? - BBC News Brasil**. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/geral-48959819>>. Acesso em: 10 maio. 2020.
- CIA, M. C. et al. Novel insights into the early stages of Ratoon Stunting disease of sugarcane inferred from transcript and protein analysis. **Genetics and Resistance**, v. 108, p. 1455–1466, 2018.
- CLARKE, M. A.; LEGENDRE, B. R. Qualidade da cana-de-açúcar: Impactos no rendimento do açúcar e fatores da qualidade. **Soc. Tec. Açúc. Alco. Bras., Açúc. Alco. Subprod.**, v. 17, n. 6, p. 36–40, 1999.
- COMSTOCK, J. C. Sugarcane yield loss due to Ratoon Stunt. **Journal Association Sugar Cane Technologists**, v. 28, n. 1990, p. 22–31, 2008.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira - Cana-de-açúcar, v. 6 - Safra 2019/20, n. 4 - Quarto levantamento - Abril 2020**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira - Cana-de-açúcar, v.7 - Safra 2019/20, n.1 - Primeiro levantamento - Maio 2020**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acesso em: 7 maio. 2020.
- DOJAS, F.; BATISTA, V. L.; MARQUES, M. O. Qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de açúcar. **Nucleus**, v. Ed. Especi, n. 2007, p. 59–66, 2009.
- GIRARDI, E. P. Agronegócio sucroenergético e desenvolvimento no Brasil. **Confins**, n. 40, p. 1–22, 14 maio 2019.
- LEGENDRE, B. et al. **Developments in sugarcane agriculture that affect processing**. Sugar Processing Research Conference Proceedings. **Anais**. 1998. Disponível em: <<https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=91126>>

- LEVY, R. B. et al. Disponibilidade de “açúcares de adição” no Brasil: Distribuição, fontes alimentares e tendência temporal. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 15, n. 1, p. 3–12, mar. 2012.
- MCFARLANE, S. The relationship between extent of colonisation by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and yield loss in different sugarcane varieties. **Proc S Afr Sug Technol Ass**, v. 76, February, p. 281–284, 2002.
- MDS, M. D. C.-S. E. DO D. S. **Brasil é o 4º maior consumidor de açúcar do mundo — MINISTÉRIO DA CIDADANIA Secretaria Especial do Desenvolvimento Social**. Disponível em: <<http://mds.gov.br/area-de-imprensa/noticias/2016/junho/brasil-e-o-4o-maior-consumidor-de-acucar-do-mundo>>. Acesso em: 10 maio. 2020.
- MENTEN, J. O. O manejo das doenças da cana e a produtividade. **Revista Opiniões**, v. 14, n. 52, p. 34–35, 2017.
- ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. D. Doenças causadas por bactérias. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_78_22122006154841.html>. Acesso em: 15 ago. 2017.
- SANTOS, L. R. et al. Avaliação de incidência de doenças foliares da cana-de-açúcar. In: DE OLIVEIRA, A.C. **Agronomia: Elo da Cadeia Produtiva 3**. Belo Horizonte: Atena, 2019. p. 21–28.
- SCAPIN, T. et al. Use of added sugars in packaged foods sold in Brazil. **Public Health Nutrition**, v. 21, n. 18, p. 3328–3334, 1 dez. 2018.
- SOUZA SILVA, A. F. DE; DA CRUZ, S. H. Brazilian Sugar in Domestic Retail: The Quality of Sugar Consumed in the State of Sao Paulo. **Natural Science**, v. 08, n. 03, p. 160–169, 2016.
- TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. F. A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. Vol 2. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. p. 219–231.
- USDA. **Sugar: World Markets and Trade circular**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://public.govdelivery.com/accounts/USDAFAS/subscriber/new>>. Acesso em: 7 maio. 2020.
- ZEKARIAS, Y. et al. Effect of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* concentration on yields of four sugarcane varieties in the sugarcane plantations of ethiopia. **Ethiopian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 25–30, 2012.
- ZHANG, X. et al. Morphological and physiological responses of sugarcane to *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* infection. **Plant Disease**, v. December, p. 1–8, 2016a

- ZHANG, X. Q. et al. Influence of inoculation of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* on photosynthetic parameters and activities of defense enzymes in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 19, n. 4, p. 1–8, 2016b.
- ZHU, K. et al. The physiological characteristics and associated gene expression of sugar cane inoculated with *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 1, p. 44–52, 1 jan. 2018.
- ZVOUTETE, P. Ratoon Stunting disease reduces cane and sugar yields of five commercial varieties grown in the south-east lowveld of Zimbabwe. **Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass.**, v. 78, p. 181–188, 2004.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma espécie de planta monocotiledônea, com metabolismo fotossintético do tipo C4, pertencente ao gênero *Saccharum* e família das Poaceae (BET, 2015; MOORE; PATERSON; TEW, 2014; SEGATO; MATTIUZ; MOZAMBANI, 2006). A planta é constituída por uma parte aérea formada por colmos, folhas e inflorescências, e uma parte subterrânea formada por raízes e rizomas (SILVA; SILVA, 2012). O colmo da planta é constituído dos nós e entrenós e é nele que a sacarose fica armazenada, tornando-o assim uma das partes com maior interesse industrial (BONNETT, 2014). No nó da planta, estão contidas as gemas que possuem o poro germinativo, o qual ao ser replantado, germina, emite um broto e dá origem a um novo colmo (SILVA; SILVA, 2012). Regiões com condições de clima tropical, alta incidência de luz, temperaturas elevadas e grandes quantidades de água são ideais para o cultivo e o desenvolvimento da cultura (MOORE; PATERSON; TEW, 2014).

O desenvolvimento da cana-de-açúcar acontece em quatro estádios diferentes. O primeiro estágio ocorre entre o plantio e a eclosão das gemas com a formação do sistema radicular e é chamado de brotação (BET, 2015; MAGRO; LACA-BUENDÍA, 2010; SEGATO; MATTIUZ; MOZAMBANI, 2006). Em seguida inicia-se o perfilhamento, momento no qual há o surgimento de novos colmos, em média entre 20 a 30 dias logo após o desenvolvimento do colmo primário (MAGRO; LACA-BUENDÍA, 2010; SEGATO; MATTIUZ; MOZAMBANI, 2006; TUTA, 2013). Quando cada touceira atinge seu máximo de perfilhos começa a acontecer o crescimento intenso da planta com o processo de alongamento dos colmos e o início do acúmulo de sacarose (MAGRO; LACA-BUENDÍA, 2010; TUTA, 2013). A maturação caracteriza o último estágio do desenvolvimento antes da colheita, no qual há o acúmulo intenso da sacarose nos colmos (AUDE, 1993; MAGRO; LACA-BUENDÍA, 2010; SEGATO; MATTIUZ; MOZAMBANI, 2006; TUTA, 2013). Esse acúmulo acontece quando a planta encontra condições que não favorecem seu crescimento e desenvolvimento como, por exemplo, déficit hídrico, escassez de nutrientes ou influência de fatores abióticos. A partir desse momento, os colmos se tornam aptos para serem colhidos e levados a indústria (AUDE, 1993; SEGATO; MATTIUZ; MOZAMBANI, 2006).

A cana-de-açúcar é uma cultura de ciclo semi-perene, ou seja, após a colheita, há a possibilidade de rebrota das plantas, permitindo assim o desenvolvimento de uma nova planta e início de um novo ciclo. Em média, cada ciclo tem duração de 12 a 18 meses e um canavial pode ter até 5 cortes antes que seja necessário fazer a sua reforma, uma vez que, a cada safra, a produtividade do canavial tende a diminuir. Durante o primeiro ciclo, período entre o plantio e o

primeiro corte, a planta recebe o nome de cana-planta, a partir daí os sucessivos ciclos e cortes recebem o nome de soqueira ou cana-soca. A produtividade da cana-de-açúcar está muito associada as características da variedade a ser utilizada, as condições e preparo do solo, condições climáticas da região, a forma como é realizada a colheita e o manejo de pragas e doenças (SILVA; SILVA, 2012; ZAVAGLIA, 2015).

2.2. Raquitismo das soqueiras

2.2.1. Agente causal

O raquitismo das soqueiras (RSD, do inglês *Ratoon Stunting Disease*) é uma das mais importantes doenças da cultura de cana-de-açúcar. É causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), responsável por colonizar os vasos de xilema da planta. A princípio acreditava-se que o raquitismo das soqueiras era causado por um vírus, devido à dificuldade no isolamento e cultivo do patógeno *in vitro* (STEINDL, 1961). Somente em 1973 foi descoberta que a doença era causada por uma bactéria e seu genoma foi sequenciado em 2004 por Monteiro-Vitorello e colaboradores. A bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, pertence ao grupo das bactérias corineformes, mede 0,25-0,5 µm por 1-4 µm, é endofítica, gram-positiva, não produz flagelos e é aeróbica obrigatória. Apresenta um crescimento fastidioso e seu isolamento, mesmo em um meio seletivo específico, é difícil. As colônias crescem geralmente após 15 dias e medem em torno de 0,1 a 0,3 mm de diâmetro, apresentando um aspecto circular, com margens inteiras, convexas e não-pigmentosas (CARNEIRO-JUNIOR, 2006; KAO; DAMANN JR., 1980; TOKESHI; RAGO, 2016). Há relatos que a Lxx consegue colonizar outras culturas além da cana-de-açúcar, como milho, sorgo e outras espécies de gramíneas. Contudo, dados publicados apontam que essas colonizações só foram observadas através de inoculações artificiais (GILLASPIE; TEAKLE, 1989a; MATSUOKA, 1984).

2.2.2. Sintomas

Os sintomas externos associados ao RSD são o crescimento irregular da planta, colmos finos e entrenós curtos. Esses sintomas externos são geralmente mais observados em plantas suscetíveis à doença e tendem a ser mais intensos a cada ciclo do canavial e sob condições ambientais adversas (BRUMATTI, 2010; CARNEIRO-JUNIOR, 2006; TOKESHI; RAGO, 2016). Internamente, observa-se o surgimento de uma coloração, na altura dos nós, conhecida

como “vírgula” que varia entre laranja-claro a vermelho-escuro (CARNEIRO-JUNIOR, 2006; GRISHAM, 1991; TOKESHI; RAGO, 2016).

Contudo, os sintomas externos e internos que são associados ao RSD podem não ser reações específicas a esta doença, uma vez que, o não desenvolvimento dos colmos em cana-de-açúcar pode ocorrer devido a condições de estresse hídrico, por exemplo, e o surgimento das vírgulas internas pode ser uma reação da planta à presença de um microrganismo qualquer. Além disso, os sintomas relacionados ao RSD podem ser confundidos com sintomas associados a outras doenças ocasionadas por outros patógenos como *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum falcatum*, *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* e *Erwinia herbicola* (RICAUD et al., 1989; TOKESHI; RAGO, 2016).

2.2.3. Disseminação

A disseminação da doença pode ocorrer durante o plantio, colheita e renovação do canavial. Na prática da colheita manual, a bactéria pode ser transferida de uma cana-de-açúcar infectada para uma sadia, através da contaminação do instrumento de corte pelo suco xilemático da planta já infectada (CARNEIRO-JUNIOR, 2006; GILLASPIE & TEAKLE, 1989; JAMES, 1996). No caso do uso de maquinário para a colheita, uma vez que os discos de cortes entram em contato com uma touceira infectada a transmissão da bactéria pode ser de 4 a pouco mais de 7 m em uma mesma linha de plantio (HOY; GRISHAM; DAMANN JR., 1999). Outra forma de infecção é através do uso de variedades já contaminadas. De acordo com Bailey e Tough (1992), a bactéria é capaz de sobreviver de dois a três meses no solo após a retirada das touceiras infectadas.

2.2.4. Perdas e distribuição

Alguns autores alegam que as perdas e reduções na produtividade podem ser maiores que 50% em variedades suscetíveis ou de baixa tolerância (GILLASPIE; TEAKLE, 1989a; TOKESHI; RAGO, 2005). Já outros trabalhos apontam que os danos causados podem chegar a ser 15 a 30% e quando associados a deficiência hídrica a queda na produtividade tende a ser mais expressiva podendo chegar a 40% (BAILEY; MCFARLANE, 1999). A doença já foi citada em pelo menos 61 países que são produtores de cana-de-açúcar no mundo. No Brasil, a doença está distribuída em todos os estados produtores da cultura (TOKESHI; RAGO, 2016). O primeiro relato da doença ocorreu em 1944 na Austrália e aproximadamente 45 anos depois, já havia sido descrita em 61

países (TOKESHI; RAGO, 2016). No Brasil a primeira aparição da doença em registros científicos publicados foi em 1956 em no Rio de Janeiro (VEIGA, 1956).

2.2.5. Diagnose

Sabe-se que a diagnose por meio dos sintomas associados ao RSD é imprecisa. A ausência de sintomas externos específicos e a não ocorrência de sintomas internos, em algumas cultivares, agrava ainda mais a detecção da doença. Além disso, outros fatores como estresses bióticos, abióticos e a presença de outros patógenos podem favorecer a manifestação de sintomas similares aos associados ao RSD (CARVALHO, 2012; DAVIS et al., 1980). Desta forma, é necessário o uso de algum método confiável de detecção do patógeno e neste sentido técnicas de imunologia, molecular e microscopia de contraste de fases vêm sendo empregadas (GAGLIARDI, 2008; SANGUINO, 1998). Técnicas como a de amplificação do DNA por reação de polimerase em cadeia (PCR) (CARVALHO et al., 2016; FU et al., 2016; GAO et al., 2008; LI et al., 2013; TAYLOR et al., 2003) microscopia de contraste de fase (GILLASPIE; DAVIS; WORLEY, 1973) e dot-blot enzyme immunoassay (DB-EIA) (GAO et al., 2008; HARRISON, N. A.; DAVIS, 1988; SHEN, 2008, 2007) têm sido utilizadas como ferramentas de identificação. Contudo, tais técnicas muitas vezes não apresentam sensibilidade suficiente para que seja feita a detecção da bactéria quando a mesma estiver presente em baixas quantidades no tecido vegetal (LÓPEZ et al., 2009).

A técnica de qPCR (do inglês: *polymerase chain reaction quantitative real time*) é uma das técnicas mais utilizadas na literatura para a detecção de Lxx (CARVALHO et al., 2016; CIA et al., 2018; FU et al., 2016; YOUNG et al., 2016; ZHANG et al., 2016b; ZHU et al., 2017). O método é mais sensível e preciso do que o PCR convencional. Além disso, a técnica de qPCR permite realizar a quantificação bacteriana sem a necessidade de procedimentos adicionais, como a confirmação da amplificação através do gel de agarose, o que torna a técnica mais rápida (CARVALHO et al., 2016). A quantificação do patógeno através da técnica de qPCR é dada com base na relação entre valores de Ct (*cycle threshold*) e das quantidades conhecidas de massas de DNA do patógeno alvo, que são determinadas através de curvas de calibração (D'HAENE; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010). Através do uso de *primers* específicos evita-se um resultado falso positivo, uma vez que há de bactérias geneticamente próximas de Lxx, como *Leifsonia xyli* subsp. *cyndontis* (Lxc) (TAYLOR et al., 2003). Carvalho (2012) ao desenvolver uma técnica específica de detecção e quantificação de Lxx por qPCR utilizou os *primers* Lxx 12950F1 e Lxx 12950R1, baseados na sequência de um gene específico de Lxx, e observou que ambos apresentaram uma ótima eficiência

de reação e especificidade, não resultando em amplificações quando foram testados em outros isolados bacterianos endofíticos de cana-de-açúcar e também em um isolado de Lxc.

2.2.6. Controle e prevenção

O controle da doença pode ser feito através da adoção de medidas preventivas, como o plantio de mudas saudáveis e a limpeza e desinfecção dos instrumentos de corte regularmente com produtos químicos que contenham bactericidas, sendo a amônia quaternária o produto mais indicado.

O tratamento térmico dos toletes antes do plantio é uma técnica de controle muito associado ao RSD, contudo alguns trabalhos relatam a presença da Lxx em toletes tratados termicamente, mostrando que a técnica não é 100% eficiente (CARVALHO, 2012; DAMANN JR.; BENDA, 1980; GRISHAM; PAN; RICHARD JR., 2007; HOY; GRISHAM; DAMANN JR., 1999; TOKESHI; RAGO, 2016; URASHIMA; ZAVAGLIA, 2012). O tratamento se dá através da imersão dos toletes em água a 50°C durante 2 a 3 horas. Contudo Iglesias (2013) alega que a temperatura utilizada pode ocasionar a morte do material vegetal, uma vez que está o limite de temperatura que planta resiste, além de pode haver a resistência da bactéria ao calor.

O uso de variedades mais resistentes também é apontado como uma forma de controle do RSD e alguns trabalhos descritos na literatura já avaliaram o nível de resistências de determinadas variedades ao RSD (BRUMATTI, 2010; GAGLIARDI; CAMARGO, 2009; LABORDE, 2019; LIMA, 2008; MCFARLANE, 2003), contudo ainda são necessários mais trabalhos em paralelo aos programas de melhoramento de plantas, para a seleção de genótipos mais resistentes ao RSD.

2.3. Compostos fenólicos

2.3.1. Compostos fenólicos na defesa das plantas

As plantas possuem uma série de mecanismos de defesa que lhes permitem responder a estresses bióticos e/ou abióticos sofridos. Através desses mecanismos as plantas podem retardar ou impedir a entrada de agentes fitopatogênicos (como bactérias e fungos) e reagir a alterações do ambiente como mudanças de temperatura e estresse hídrico, por exemplo (FERNANDES et al., 2009; PASCHOLATI; DALIO, 2018).

A resposta de uma planta a um ataque ou a um estresse abiótico pode acontecer através de mecanismos de defesa constitutivos e/ou induzidos. As respostas constitutivas também são conhecidas como mecanismo de defesa pré-formados ou passivos e consistem em substância já presentes nas plantas antes mesmo do reconhecimento de um patógeno. Já no caso das respostas induzidas (também chamados de mecanismos pós-formados ou ativos), os mecanismos de defesa não estão presentes nas plantas ou aparecem em baixas quantidades e passam a ser produzidos após um ataque de um agente fitopatogênico ou após o início de uma situação de estresse abiótico (FERNANDES et al., 2009; PASCHOLATI; DALIO, 2018; SALGADO, 2009). As formas de defesas constitutivas e induzidas ainda podem ser divididas em dois grupos: os mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos. No caso dos estruturais, há o impedimento da entrada do patógeno por barreiras físicas impostas pelas plantas como, por exemplo, o fechamento dos estômatos (um tipo de mecanismo de defesa constitutivo) e a lignificação (uma forma de mecanismo de defesa induzido). Em relação aos mecanismos de defesa bioquímicos, há a produção de substâncias que podem ser tóxicas ao agente fitopatogênico, ou até mesmo que podem dificultar o crescimento do patógeno e alguns exemplos são: as espécies ativas de oxigênio (como mecanismo de defesa induzido) e a produção de fenóis (como mecanismo de defesa constitutivo) (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

Os fenólicos são uma classe de compostos que fazem parte do metabolismo secundário das plantas. Em geral, eles podem estar associados a: características como coloração e sabor de plantas, frutos e alimentos processados a base de plantas; a processos de escurecimento ocasionados durante o processamento e armazenamento de produtos; e aos mecanismos de defesa das plantas contra estresses bióticos e abióticos (CHEYNIER, 2012; KULBAT, 2016; LAT'TANZIO, 2013).

Alguns compostos fenólicos muito associados a defesa de plantas são: os ácidos gálico, clorogênico e o caféico (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Todos eles fazem parte da rota de produção de lignina, que é iniciada pela ação da enzima reguladora fenilalanina amônia-liase (do inglês: *phenylalanine ammonia lyase* – PAL) (CIA et al., 2018; GUIDI et al., 2004; NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992), como apresentado na Figura 1. Muitos trabalhos mostram um aumento na atividade da PAL durante e após um ataque ou um ferimento causado por um patógeno (LEBEDA et al., 2001).

Figura 1. Rota de produção de alguns compostos fenólicos em plantas a partir da fenilalanina amônia-liase (PAL) (adaptado Guidi et al. (2004)).

2.3.2. Compostos fenólicos como precursores de cor em caldo de cana-de-açúcar

Os principais componentes precursores de cor no caldo de cana-de-açúcar são os pigmentos vegetais, caramelos, produtos de degradação dos açúcares e compostos fenólicos (fenólicos e flavonóides) (OGANDO, 2019; REIN, 2007; SINGH et al., 2015). Muitas substâncias contidas na estrutura vegetal da cana-de-açúcar acabam sendo incorporadas ao caldo após a extração como a clorofila, as antocianinas, sacaretinas e polifenóis (ARAÚJO, 2007; GODSHALL, 1996; GODSHALL; GRIMM, 1994; HARBORNE, 1984; PATON, 1992a; SMITH; PATON, 1985). De acordo com Paton (1992b), uma vez que o tecido da cana-de-açúcar é cortado e exposto ao contato com ar, os fenóis presentes no tecido vegetal sofrem oxidação enzimática o que leva a formação de quinonas e polímeros de coloração escura, causando o escurecimento enzimático nos tecidos. Os ácidos fenólicos e flavonóides são responsáveis pela coloração tanto do caldo de cana-de-açúcar, quanto do açúcar bruto produzido (CLARKE; LEGENDRE, 1999; GODSHALL, 1996; PATON, 1992b).

Os ácidos fenólicos possuem um grupo hidroxila ligado a um anel aromático (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; LATTANZIO, 2013), sendo geralmente derivados de ácido cinâmico

($C_9H_8O_2$) e facilmente oxidados (PATON, 1992a). Farber e Carpenter (1971) observaram a presença de inúmeros pigmentos na cana-de-açúcar, além da presença de ácidos fenólicos como: ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido sirínico e ácido vanílico. Paton (1992b) alega que o composto fenólico mais comum encontrado na cana-de-açúcar é o ácido clorogênico ($C_{16}H_{18}O_9$). E Duarte-Almeida e colaboradores (2006) identificaram que os compostos fenólicos majoritários no caldo de cana-de-açúcar são os ácidos hidroxicinâmico como o ácido caféico ($C_9H_8O_4$) e ácido sinapínico ($C_{11}H_{12}O_5$). Zhao e colaboradores (2008) obtiveram que os maiores ácidos fenólicos presentes no caldo são os ácidos gálico, caféico e ferúlico.

Os flavonóides são outro grupo de metabólitos secundários. Estruturalmente, os flavonóides possuem 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos que são ligados por uma cadeia de três carbonos (FERREIRA; DE OLIVEIRA; DOS SANTOS, 2008). Antocianinas, catequinas, chalconas, flavonóis e flavonas foram identificadas na cana-de-açúcar e em produtos derivados dela descritas na cana-de-açúcar por Smith e Paton (1985), enquanto que, Duarte-Almeida et al. (2006) e Ali e colaboradores (2019) identificaram que a maior classe de flavonóides presente no caldo de cana-de-açúcar são flavonas, como a apigenina ($C_{15}H_{10}O_5$) e a luteolina ($C_{15}H_{10}O_6$). Compostos derivados de apigenina e luteolina tendem a ser mais suscetíveis a oxidações enzimáticas (SMITH; PATON, 1985).

Os compostos fenólicos podem ser oxidados em polímeros de cor escura, através de reações de escurecimento enzimático ou não enzimático, tais reações podem ocorrer devido ao aumento de pH e temperatura, características do processamento da matéria-prima, e devido a condições de armazenamento do açúcar (PATON, 1992a). Ogando (2019) alega que caldos muito escuros tendem a aumentar o custo de produção e podem ter efeito negativo na comercialização do açúcar.

2.4. Produção de açúcar

A cana-de-açúcar é a matéria-prima utilizada para na produção de açúcar e do etanol, porém esses não são os únicos produtos obtidos e utilizados a partir do processamento da cana-de-açúcar. As etapas de produção de açúcar e do álcool geram alguns subprodutos, que possuem alto valor comercial e podem ainda, substituir outros produtos da própria cadeia de produção do açúcar e álcool e assim reduzir os custos de produção (CORTEZ; MAGALHÃES; HAPPI, 1992).

Após a colheita, a cana-de-açúcar é transportada até a indústria, onde são realizadas coletas aleatórias das cargas que chegam de acordo com critérios estabelecidos pelo Conselho dos Produtores de Cana de Açúcar, Açúcar e Etanol (CONSECANA). A amostragem tem como

objetivo aferir a qualidade da matéria-prima a ser descarregada, bem como realizar o pagamento do fornecedor de cana-de-açúcar (CONSECANA, 2015; GURGEL, 2012).

Após a amostragem e pesagem, é realizada a limpeza da cana-de-açúcar, de modo a eliminar impurezas que tenham vindo juntamente com o corte e carregamento no campo. Devido a Lei Estadual nº 11.241, de 19 de setembro de 2002, houve um aumento na colheita de forma mecanizada e com isso houve um acréscimo na quantidade de impurezas vegetal e mineral que chegam à indústria (GURGEL, 2012; HAMERSKI, 2009; PAYNE, 1989). Para a limpeza da cana, há dois sistemas que podem ser empregados de acordo com a forma como a cana-de-açúcar foi colhida: para cana colhida inteira é realizada a limpeza com água, enquanto que para a cana colhida de forma picada, a limpeza é feita à seco, utilizando jatos de ar (AMORIM et al., 2004; GURGEL, 2012; PAYNE, 1989). Em seguida a cana-de-açúcar deve passar pelo preparo, onde o material vegetal é picado e desintegrado, o que permitirá uma maior eficiência de extração do caldo na etapa seguinte. Antes da extração, a porção desintegrada de cana passa pelo separador magnético a fim de reter qualquer fragmento de aço ou ferro proveniente do campo (GURGEL, 2012; HAMERSKI, 2009; PAYNE, 1989).

A extração do caldo pode ser realizada através de difusores ou moendas. No caso da moenda, a mais utilizada no Brasil, a separação das frações líquida (caldo) e sólida (bagaço) ocorre através da compressão que a cana sofre ao passar por rolos. Um conjunto de rolos é chamado de terno da moenda e cada moenda é geralmente formada por quatro a sete ternos seguidos. No primeiro terno, é obtido o caldo primário e logo em seguida, a relação entre caldo e fibra diminui, o que leva a uma redução na eficiência da extração. Nos ternos seguintes torna-se necessário fazer injeção de água (procedimento conhecido como embebição) para auxiliar a máxima extração do caldo restante. O caldo que é obtido após a embebição leva o nome de caldo secundário e a sua mistura com o caldo primário recebe o nome de caldo misto. O bagaço residual pode ser utilizado como combustível para caldeira, produção de energia, celulose e alimentação de gado confinado (GURGEL, 2012; HAMERSKI, 2009; PAYNE, 1989).

O tratamento do caldo misto tem o objetivo de eliminar as impurezas insolúveis e solúveis, de maneira que, durante o processo ocorra a menor perda possível de sacarose. Na primeira etapa do tratamento do caldo misto é realizada a eliminação das impurezas (como areia, bagacilhos residuais da extração, entre outros) através do peneiramento e neste caso, podem ser utilizadas três tipos de peneiras: as fixas, as rotativas e as vibratórias. Em seguida, o caldo passa pelo processo de tratamento químico, que visa eliminar as impurezas solúveis e coloidais. O tratamento químico pode ser feito apenas com o processo de caleagem (no caso da produção de açúcar VHP e VVHP) ou então com a caleagem somada a sulfitação (no caso da produção de

açúcar cristal branco) (GURGEL, 2012; HAMERSKI, 2009; PAYNE, 1989). A caleagem consiste na adição de leite de cal (ou cal hidratada (Ca(OH)_2)) com o objetivo de neutralizar os ácidos orgânicos. A adição é feita até que o pH do caldo fique entre 7,0 e 7,5 e sequencialmente o caldo é aquecido de 90 a 105 °C. No processo de sulfitação, primeiramente é feita a adição do dióxido de enxofre gasoso (SO_2) no caldo misto até que ocorra a redução do pH para uma faixa de 4,0 a 4,5. Em seguida o caldo é aquecido, a aproximadamente 40 °C, e depois é realizado o processo de caleagem. A adição do SO_2 somada ao aquecimento e a caleagem promovem a formação de um precipitado o sulfito de cálcio (CaSO_3) que carrega consigo as impurezas ainda presentes caldo. Após o tratamento, o caldo passa por um decantador, o qual permite a separação entre a fração líquida (caldo clarificado) e a fração sólida (lodo). O lodo passa por um processo de filtração, para que o açúcar residual nele seja recuperado. A fração líquida da filtração retorna ao processo (caldo filtrado) e a fração sólida recebe o nome de torta de filtro. Em média cada tonelada de cana produz de 20 a 40 quilos de torta, a qual possui 75% de umidade e é usada como fertilizante por ser rica em fósforo (GURGEL, 2012; HAMERSKI, 2009; PAYNE, 1989; REIN, 2007; TFOUNI; VITORINO; TOLEDO, 2007).

O próximo passo da produção de açúcar é a etapa de evaporação. Nesta, o caldo (com 15 °Brix aproximadamente) é concentrado, através da evaporação da água, tornando-se um xarope (com aproximadamente 55 a 65 °Brix). O processo de evaporação acontece de maneira contínua através de caixas que formam o evaporador, em média são de quatro a cinco caixas conectadas em sequência. O vapor é injetado para aquecer somente a primeira caixa, nas caixas seguintes o aquecimento é feito pelo vapor da própria água do caldo que evapora. Assim que é formado, o xarope segue para a etapa de cozimento. Nessa etapa do processo, o xarope é concentrado dentro de equipamento conhecidos como cozedores, até a formação de uma massa cozida. A massa cozida passa para a centrifugação, para que seja feita a separação dos cristais de sacarose e a cobertura de mel, que envolve os cristais. O mel residual dessa separação, forma o melaço e os cristais de sacarose seguem adiante para a fase de secagem, para eliminar a umidade residual e poder seguir para o empacotamento e armazenamento (GURGEL, 2012; TFOUNI; VITORINO; TOLEDO, 2007). O armazenamento inadequado pode ocasionar um escurecimento do açúcar o que pode influenciar a decisão de compra por parte do consumidor (AGUIAR et al., 2015).

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L. DE et al. Factors affecting color formation during storage of white crystal sugar. **Focusing on Modern Food Industry**, v. 4, p. 1-8, 2015.
- ALI, S. E. et al. Profiling metabolites and biological activities of sugarcane (*Saccharum Officinarum* Linn.) juice and its product molasses via a multiplex metabolomics approach. **Molecules**, v. 24, n. 5, 2019.
- AMORIM, H. V. et al. Qualidade da cana-de-açúcar e seu impacto na indústria. In: RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C. (Eds.). **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. 1. ed. Piracicaba: Barros e Marques Editoração Eletrônica, 2004. p. 185–193.
- ARAÚJO, F. A. D. Processo de clarificação do caldo de cana pelo método da bicarbonatação. **Revista Ciências & Tecnologias**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2007.
- AUDE, M. I. DA S. Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar e suas relações com a produtividade. **Ciência Rural**, v. 23, n. 2, p. 241–248, 1993.
- BAILEY, B. R. A.; TOUGH, S. A. Rapid spread of ratoon stunting disease during manual harvesting of sugarcane and the effect of knife cleaning on the rate of spread. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, p. 78–81, 1992.
- BET, J. A. **Indutores de maturação e a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar**. 2015. 112 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.
- BONNETT, G. D. Developmental stages (phenology). In: MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. (Eds.). **Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology**. Chichester: John Wiley & Sons Inc, 2014. p. 35–53.
- BRUMATTI, C. R. **Comportamento de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em inoculações com diferentes concentrações de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, 2010.
- CARNEIRO-JUNIOR, J. B. **Efeito do tratamento térmico e da inoculação de bactérias endofíticas no controle do raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar**. 2006. 92 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006.
- CARVALHO, G. DE. **Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras**. 2012. 144 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2012.

- CARVALHO, G. et al. Development of a qPCR for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and quantification of the effects of heat treatment of sugarcane cuttings on Lxx. **Crop Protection**, v. 80, p. 51–55, 2016.
- CHEYNIER, V. Phenolic compounds: From plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 2–3, p. 153–177, jun. 2012.
- CIA, M. C. et al. Novel insights into the early stages of ratoon stunting disease of sugarcane inferred from transcript and protein analysis. **Genetics and Resistance**, v. 108, p. 1455–1466, 2018.
- CLARKE, M. A.; LEGENDRE, B. R. Qualidade da cana-de-açúcar: Impactos no rendimento do açúcar e fatores da qualidade. **Soc. Tec. Açúc. Alco. Bras., Açúc. Alco. Subprod.**, v. 17, n. 6, p. 36–40, 1999.
- CONSECANA. **Manual de Instruções CONSECANA-SP**. 6. ed. Piracicaba: CONSECANA-SP, 2015.
- CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P. S. G.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, v. 2, n. 2, p. 1–17, 1992.
- DAMANN JR., K. E.; BENDA, G. T. A. Plant disease: An international journal of applied plant pathology. **American Phytopathological Society**. v. 67, n.9, p. 966-967, 1980
- DAVIS, M. J. et al. Ratoon stunting disease of sugarcane: Isolation of the causal bacterium. **Science (New York, N.Y.)**, v. 210, n. 4476, p. 1365–1367, 1980.
- DAVIS, M. J.; DEAN, J. L.; HARRISON, N. A. Quantitative variability of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* populations in sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, v. 78, n. 4, p. 462–468, 1988.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, n. 4, p. 187–192, dez. 2006.
- FARBER, L.; CARPENTER, F. G. Identification of sugar colorants. **Agricultural Research Service is USDA's**, v. 72, 1971.
- FERNANDES, C. DE F. et al. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. **Documentos Embrapa Rondonia**. v. 1, p. 14, 2009.
- FERREIRA, M. M. M.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; DOS SANTOS, N. S. Flavonas e flavonóis: Novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. **Revista Agro@mbiente**, v. 2, n. 2, p. 57–60, jun. 2008.
- FU, H. Y. et al. Rapid and quantitative detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane stalk juice using a real-time fluorescent (TaqMan) PCR assay. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

- GAGLIARDI, P. R. **Avaliação da resistência à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-da-soqueira (RSD), em variedades comerciais de cana-de-açúcar.** 2008. 119 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
- GAO, S. J. et al. Quick detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* isolates. **Sugar Tech**, v. 10, n. 4, p. 334–340, 2008.
- GILLASPIE, A. G. . J.; DAVIS, R. E.; WORLEY, J. F. Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of a specific micro-organism. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n. 12, p. 987–990, 1973.
- GILLASPIE, A. G.; TEAKLE, D. S. Ratoon stunting disease. In: **Diseases of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 399.
- GODSHALL, M. A. Recent progress in sugar colourants: GC-MS. **Proceedings of the South African Sugar Technologist's Association**, v. 70, p. 153–161, 1996.
- GODSHALL, M. A.; GRIMM, C. G. Leucoanthocyanins, aconitic acid and turbidity in sugarcane. An update on cane colourants. **Sugar Processing Research Institute, Inc., Conference, Proceedings**, p. 334–357, 1994.
- GRISHAM, M. P. Effect of ratoon stunting disease on yield of sugarcane grown in multiple three-year plantings. **Phytopathology**, v. 81, n. 3, p. 337–340, 1991.
- GRISHAM, M. P.; PAN, Y.-B.; RICHARD JR., E. P. Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. **Plant Disease**, v. 91, n. 4, p. 430–434, 2007.
- GUIDI, L. et al. Photosynthetic process and activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in resistant and sensitive genotypes of *Lycopersicon esculentum* L. exposed to ozone. **Plant Science**, v.168, p.153-160, 2004.
- GURGEL, M. N. DO A. **Tecnologia para aproveitamento de resíduos da agroindústria sucroalcooleira como biofertilizante organomineral granulado.** 2012. 114 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, 2012.
- HAMERSKI, F. **Estudo de variáveis no processo de carbonatação do caldo de cana-de-açúcar.** 2009, 148 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, 2009.
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis.** New York: Springer Netherlands, 1984.

- HARRISON, N. A.; DAVIS, M. J. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, v. 78, n. 6, p. 722–727, 1988.
- HOY, J. W.; GRISHAM, M. P.; DAMANN JR., K. E. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. **Plant Disease**, v. 83, n. 12, p. 1170–1175, 1999.
- JAMES, G. A review of ratoon stunting disease. **International Sugar Journal**, v. 98, p. 1174, 1996.
- KAO, J.; DAMANN JR., K. E. In situ localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. **Canadian Journal of Botany**, v. 58, n. 3, p. 310–315, fev. 1980.
- KULBAT, K. The role of phenolic compounds in plant resistance. **Biotechnology and Food Sciences**, v. 80, n. 2, p. 97–108, 2016.
- LATTANZIO, V. Phenolic compounds: Introduction. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J. M. (Eds.). **Natural Products**. [s.l.] Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 2013. p. 1543–1580.
- LEBEDA, A. et al. The role of enzymes in plant-fungal pathogens. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 108, n. 1, p. 89–111, 2001.
- LI, W.-F. et al. PCR detection of ratoon stunting disease pathogen and natural resistance analysis in sugarcane core germplasms. **Crop Protection**, v. 53, p. 46–51, 2013.
- LÓPEZ, M. M. et al. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Current issues in molecular biology**, v. 11, n. 1, p. 13–46, 2009.
- MAGRO, C. R.; LACA-BUENDÍA, J. P. Efeito da profundidade de plantio no perfilhamento da cana-de-açúcar. **FAZU em Revista**, n. 7, p. 48–54, 2010.
- MOORE, P. H.; PATERSON, A. H.; TEW, T. Sugarcane: The crop, the plant, and domestication. In: MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. (Eds.). **Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2014. p. 1–17.
- NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 30, p. 369–389, 1992.
- OGANDO, F. I. B. **Aplicação da eletrocoagulação na purificação e clarificação do caldo de cana-de-açúcar**. 2019. 138 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2019.
- PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. p. 423–452.

- PATON, N. H. The origin of colour in raw sugar. **Proc. Australian Soc. Sugarcane Technol.**, v.14, p. 8-17, 1992a.
- PATON, N. H. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part I. Determination of chlorogenic acid and other phenolics in sugar cane by HPLC. **International Sugar Journal**, v. 94, p. 99–108, 1992b.
- PAYNE, J. H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana**. 1. ed. [s.l.] Nobel, 1989.
- REIN, P. W. **Cane sugar engineering**. 2nd ed. Berlin: Bartens, 2007.
- SALGADO, P. R. **Compostos fenólicos relacionados à resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*)**. 2009. 109 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
- SANGUINO, A. Diagnóstico e controle do raquitismo da soqueira causado pela bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 17, p. 26, 1998. Resumo.
- SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M.; MOZAMBANI, A. E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: [s.n.]. p. 19–36.
- SHEN, W-K. Studies on eliminating *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, the causal agent of sugarcane ratoon stunting disease by combining hot water treatment with callus culture technique. **Sugarcane and Canesugar**, v. 5, p. 5, 2007.
- SHEN, W-K. et al. Studies on control effect of hot water treatment on sugarcane ratoon stunting disease by and its influence on regenerative plants. **Journal of Yunnan Agricultural University**, v. 4, p. 10, 2008.
- SILVA, J. P. N.; SILVA, M. R. N. Noções da Cultura da Cana-de-Açúcar. p. 105, 2012.
- SINGH, A. et al. Phytochemical profile of sugarcane and its potential health aspects. **Pharmacogn Rev.**, v. 9, n. 17, p. 45–54, 2015.
- SMITH, P.; PATON, N. H. Sugarcane Flavonoids. **Sugar Technology Reviews**, v. 12, p. 117–142, 1985.
- STEINDL, D. R. L. Ratoon stunting disease. In: **Sugar cane disease of the world**. Amsterdam: Elsevier S. p. 433–459, 1961.
- TAYLOR, P. W. J. et al. Development of PCR-based markers for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in fibrovascular fluid of infected sugarcane plants. **Australasian Plant Pathology**, v. 32, n. 3, p. 367–375, 2003.
- TFOUNI, S. A. V.; VITORINO, S. H. P.; TOLEDO, M. C. DE F. Efeito do processamento na contaminação de cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 27, n. 1, p. 76–82, 2007.

- TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. F. A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Vol 2.** 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. p. 219–231.
- TUTA, N. F. **Desenvolvimento e produtividade da cana-de-açúcar no ciclo da cana-planta com aplicação de efluente de esgoto tratado via gotejamento subsuperficial.** 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola - Universidade Estadual de Campinas, 2013.
- URASHIMA, A. S.; GRACHET, N. G. Detection method for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and effect of thermotherapy on bud germination in sugarcane varieties. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 1, p. 57–64, 2012.
- ZAVAGLIA, A. C. **Levantamento de hospedeiros alternativos de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e análise de genótipos de sorgo como hospedeiros experimentais.** 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2015.
- ZHAO, Z.-G. et al. Simultaneous determination of ten major phenolic acids in sugarcane by a reversed phase HPLC method. **Sugar Industry**, v. 133, n. August 2014, p. 1–7, 2008.

3. EFEITO DO RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS NA QUALIDADE E CARACTERÍSTICA DO CALDO DE CANA-PLANTA

RESUMO

O raquitismo das soqueiras é uma das doenças que mais afeta a cultura da cana-de-açúcar. A falta de sintomas específicos é um dos principais motivos para a sua disseminação. Plantas infectadas apresentam porte reduzido e colmos finos e a intensidade dos danos tende a ser mais severa na presença de outras doenças, na ausência de água, entre outros fatores. Pouco se sabe sobre o impacto da doença na produção de açúcar, desta forma, o objetivo foi avaliar o efeito do raquitismo das soqueiras na qualidade e características do caldo de cana-planta. Para isso foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação, com condições controladas durante um período de seis meses cada. Cada experimento contou com duas variedades (suscetível e de resistência intermediária) e dois tratamentos (inoculado e controle). A quantificação do título bacteriano foi feita por PCR em tempo real (qPCR) e as amostras de caldo foram avaliadas através de análises tecnológicas, físico-químicas, cromaticidade pelo espaço de cor CIELAB e quantificação de compostos fenólicos em sistema cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC). A doença não aparentou reduzir a qualidade do caldo de cana-planta em nenhuma das variedades estudadas, uma vez que as amostras inoculadas apresentaram os maiores valores para brix^o/caldo, pol^o/caldo, pureza, açúcares totais recuperáveis (ATR), os quais indicam uma boa qualidade da matéria-prima para a indústria. As mesmas amostras ainda apresentaram menores teores de cor ICUMSA, fibra%cana, fenólicos totais e flavonóides totais. A porcentagem de açúcares redutores%cana (ARC) foi menor em amostras inoculadas da variedade CB49-260 e maior nas amostras inoculadas da variedade SP80-3280. A menor concentração de ARC em amostras da variedade padrão suscetível pode estar relacionado ao consumo de glicose pela bactéria como fonte de carbono para o seu desenvolvimento. Para a análise de cromaticidade do caldo, as amostras inoculadas apresentaram maior luminosidade e croma, indicando que eram mais claras e brilhantes, do que os controles. Todas as amostras foram classificadas no primeiro quadrante (região de coloração de vermelho-amarelo) do espaço de cor CIELAB. Cinco grupos de compostos fenólicos puderam ser quantificados nas amostras de caldo de cana-planta. A variedade CB49-260 apresentou as maiores concentrações de flavonas, flavonóis e flavanonas o que pode ter contribuído com a classificação das mesmas amostras no espaço de CIELAB mais próximas do ângulo de 90° (amarelo). Já a variedade SP80-3280, que apresenta maior resistência à doença, teve as maiores concentrações para ácidos benzóico e hidroxicinâmico, compostos fenólicos que são associados a mecanismos de defesa das plantas. As variedades puderam ainda ser totalmente separadas em uma análise discriminante devido ao perfil de compostos fenólicos presentes nos caldos. O que mostra que o grupo de compostos fenólicos em cada caldo é bem específico de acordo com a variedade.

Palavras-chave: Cromaticidade do caldo; Espaço de cor CIELAB; Ácidos fenólicos, Flavonóides.

ABSTRACT

Ratoon stunting disease is one of the diseases that most affects the culture of sugarcane. The lack of specific symptoms is one of the main reasons for its spread. Infected plants have a reduced size and thin stems and the intensity of the damage tends to be more severe in the presence of other diseases, in the absence of water, among other factors. Little is known about the impact of the disease on sugar production, so the objective was to evaluate the effect of ratoon stunting disease on the quality and characteristics of plant cane juice. For this, two experiments were conducted in a greenhouse, with controlled conditions for a period of six months each. Each experiment had two varieties (susceptible and intermediate resistance) and two treatments (inoculated and control). The quantification of the bacterial titer was made by real-time PCR (qPCR) and the juice samples were evaluated through technological, physical-chemical analysis, chromaticity by CIELAB color space and quantification of phenolic compounds in ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC). The disease did not appear to reduce the quality of the plant cane juice in any of the studied varieties, since the inoculated samples presented the highest values for brix% juice, pol% juice, purity, total recoverable sugars (TRS), which indicate good quality of the raw material for the industry. The same samples also showed lower levels of ICUMSA color, fiber% cane, total phenolics and total flavonoids. The percentage of reducing sugars% sugarcane (RRS) was lower in inoculated samples of variety CB49-260 and higher in inoculated samples of variety SP80-3280. The lower concentration of RRS in samples of the susceptible standard variety may be related to the consumption of glucose by the bacteria as a carbon source for its development. For the analysis of chromaticity of the juice, the inoculated samples showed greater luminosity and chroma, indicating that they were clearer and brighter than the controls. All samples were classified in the first quadrant (red-yellow color region) of the CIELAB color space. Five groups of phenolic compounds could be quantified in the samples of plant cane juice. The CB49-260 variety showed the highest concentrations of flavones, flavonols and flavanones which may have contributed to the classification of the same samples in the CIELAB space closer to the 90° angle (yellow). The SP80-3280 variety, which is more resistant to the disease, had the highest concentrations for benzoic and hydroxycinnamic acids, phenolic compounds that are associated with plant defense mechanisms. The varieties could also be totally separated in a discriminant analysis due to the profile of phenolic compounds present in the juices. Which shows that the group of phenolic compounds in each juice is very specific according to the variety.

Keywords: Chromaticity of the juice; CIELAB color space; Phenolic acids; Flavonoids.

3.1. Introdução

Diversos fatores podem limitar a produtividade e o rendimento industrial da cana-de-açúcar, como, deficiência hídrica e nutricional, trato cultural inadequado e a ocorrência de pragas e doenças (CARNEIRO-JUNIOR, 2006; GAGLIARDI, 2008; SILVA, 2015). O ataque de pragas pode impactar diretamente nos indicadores de qualidade da matéria-prima, como por exemplo, o

teor de açúcares totais recuperáveis (ATR), atual indicador utilizado para o pagamento dos fornecedores de cana-de-açúcar do estado de São Paulo (JR. ROSSATO, 2020). O raquitismo das soqueiras (RSD, do inglês *Ratoon Stunting Disease*) é uma doença que acomete a cultura da cana-de-açúcar e é causada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) (YOUNG, 2018). O primeiro relato da doença ocorreu em 1944 na Austrália e em 1989 já havia sido descrita em 61 países (TOKESHI; RAGO, 2016). No Brasil um dos primeiros relatos publicados foi em 1956 no Rio de Janeiro (VEIGA, 1956). A doença não está relacionada a morte da planta, mas sim a uma redução na produtividade. Os danos causados podem chegar a 50%, contudo quando associados a deficiência hídrica, a queda na produtividade pode ser ainda mais severa (BAILEY; MCFARLANE, 1999).

Pouco se sabe sobre o impacto que o raquitismo das soqueiras tem na produção de açúcar e álcool, principais produtos obtidos a partir da cana-de-açúcar. De maneira geral, os trabalhos descritos na literatura abordam o rendimento de sacarose, parâmetros de rendimento (altura, peso, diâmetro dos colmos) e em produtividade por hectares (BAILEY; BECHET, 1986, 1995; COMSTOCK, 2008; DEAN; DAVIS, 1990; KAZEEM; IKOTUN, 2019), entretanto dados sobre parâmetros tecnológicos, que são utilizados para aferir a qualidade da matéria-prima, como índices de sólidos solúveis (brix%caldo), porcentagem em massa de sacarose aparente (pol%caldo), pureza aparente do caldo, entre outros, ainda são pouco difundidos.

O Conselho de Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Etanol do Estado de São Paulo (Consecana) tem como objetivo uniformizar as informações para a avaliação da matéria-prima e consequente pagamento. Além dos parâmetros indicados pelo Consecana, outros índices são essenciais para avaliar a qualidade do caldo que é usado na produção do açúcar, como por exemplo, a cor ICUMSA (do inglês: *International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis*), turbidez e concentração de compostos fenólicos, uma vez que, esses três fatores podem afetar a produção de açúcar. Valores altos de cor ICUMSA e turbidez no caldo podem acarretar em açúcares com alta coloração o que dificulta a comercialização. Além disso, se as partículas suspensas e impurezas não são totalmente removidas do caldo, durante o tratamento, elas podem interferir na transferência de calor nos evaporadores, além de atrapalharem a cristalização e centrifugação (EGGLESTON et al., 2014).

Compreender o perfil de compostos fenólicos que estão naturalmente presentes na cana-de-açúcar é essencial para a produção do açúcar, uma vez que, eles podem promover o aumento de cor tanto no caldo, quanto no açúcar. Muitos trabalhos já relataram o perfil de compostos naturalmente presentes em diferentes partes da cana-de-açúcar (COLOMBO et al., 2005; COLOMBO; LANÇAS; YARIWAKE, 2006; COUTINHO et al., 2016; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; OGANDO et al., 2019; PATON, 1992b; SMITH; PATON, 1985; ZHAO et al., 2008).

No caldo, os ácidos fenólicos mais citados são os ácidos caféico, gálico e ferúlico (ZHAO et al., 2008).

A cor ICUMSA é um dos parâmetros utilizados para se aferir a cor do caldo e do açúcar. Através da metodologia é possível determinar a o valor de forma numérica da cor de uma amostra, no entanto o conceito de cor não deve ser investigado apenas através de um único fator. A análise da cor de uma amostra ou objeto pelos parâmetros do espaço de cor CIELAB permite uma descrição mais ampla, através de três atributos: a luminosidade (fator que indica se a cor é mais clara ou escura), croma (fator que indica se a cor é mais ou menos saturada) e a tonalidade, os quais permitem muitas vezes diferenciar colorações que são muito semelhantes a olho nu (DE ANNUNZIO et al., 2012; FERREIRA; SPRICIGO, 2017). Desta forma, a compreensão da cor de uma substância ou de um objeto não fica restrita a apenas um único conceito, como é o caso da cor ICUMSA.

Diante deste cenário, o objetivo foi avaliar o impacto do raquitismo das soqueiras no caldo de cana-de-açúcar em duas variedades (suscetível e de resistente intermediária à doença) de cana-planta (primeiro corte) através de análises tecnológicas, físico-químicas, cromaticidade do caldo pelo espaço de cor CIELAB e quantificação dos compostos fenólicos no caldo.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Cultivo bacteriano

O cultivo e crescimento do inoculo da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (estirpe CTCB07) foi realizado em meio MscNew líquido (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). O meio era composto por: 4,0 g de peptona de soja, 0,1 g de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 5 mL de fosfato dipotássico (K_2HPO_4) 0,1 M, 5 mL de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) 0,1 M, 15 mL de solução de 0,1% de hemina bovina em hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 M e 500 mL de água destilada. Para o preparo de meio sólido foram adicionados ainda 10,5 g de ágar bacteriológico. Com o auxílio de uma solução de NaOH 1 M, ajustou-se o pH do meio líquido para 7,5 sendo em seguida, esterilizado por autoclavagem à 1 atm por 20 min e após o resfriamento foram adicionados 50 mL de suplemento 10% (v/v) composto por: 2,5 g de glicose, 0,25 g de cisteína, 1,0 g de albumina bovina – fração V e 0,25 g de metionina. Antes da adição, o suplemento foi esterilizado com o auxílio de um filtro com porosidade de 0,22 μm (Millipore®). O preparo do inóculo foi realizado através da transferência de 1 mL de cultura de Lxx, conservada em glicerol 50% (v/v), em meio MscNew líquido que ficou incubado à 28 °C, sob constante agitação de 150 rpm até atingir a absorbância de 0,7. Periodicamente, com alíquotas de 1 mL, foram

aferidas as absorbâncias à 600 nm em espectrofotômetro, até que se confirmasse que a cultura estava em fase log de crescimento e prosseguisse com a inoculação no material vegetal. Como leitura de referência (branco) era utilizado o meio de cultura sem o inóculo de Lxx (CARVALHO, 2012). A confirmação da pureza do inóculo foi realizada através do plaqueamento em meio de cultura sólido (meio MscNew) com a contagem do número de UFC (Unidade Formadora de Colônias).

3.2.2. Cultivo e inoculação do material vegetal em casa de vegetação

Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” com condições controladas de temperatura média de 25,5 °C e umidade relativa do ar de 58%. O primeiro experimento (denominado Exp.1) ocorreu entre agosto/2016 a fevereiro/2017 e o segundo (denominado Exp.2) ocorreu entre janeiro/2017 a julho/2017. Em ambos os casos foram cultivadas as variedades SP80-3280 e CB49-260, de resistência intermediária e suscetível RSD, respectivamente de acordo com Ros (2004). As gemas das variedades utilizadas foram plantadas em bandejas para mudas de 0,5 mL em agosto/2016 (Exp.1) e janeiro/2017 (Exp.2) (Figura 2).

Figura 2. Plantio e desenvolvimento das gemas das variedades SP80-3280 (A) e CB49-260 (B), em agosto/16 (Exp.1) antes do transplante para vasos e inoculação das plantas.

Após 30 dias, 12 mudas de cada variedade, foram selecionadas e transplantadas para vasos de 40 L contendo substrato Basaplant (Base, Brasil) e aproximadamente 49,09 g de adubo NPK (Drago, Brasil) de formulação 10-10-10. Cada variedade teve seis vasos selecionados para o tratamento controle (plantas sem inoculação bacteriana) e seis vasos para o tratamento inoculado (plantas inoculadas com solução bacteriana), totalizando 24 vasos por experimento que foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizados (Figura 3).

Para as inoculações foi feito o preparo de um tampão PBS (tampão fosfato-salino) 100 M, pH 7,4 composto por: 8 g de cloreto de sódio (NaCl) 137 mM, 0,2 g de cloreto de potássio (KCl) 2,7 mM, 1,44 g de fosfato dissódico (Na_2HPO_4) 10 mM, 0,24 g de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) 2 mM. As células bacterianas presentes no inóculo de Lxx (Item 3.2.1) foram precipitadas por centrifugação a 5000 rpm durante 30 min, o sobrenadante foi descartado e as células bacterianas foram ressuspensa em tampão PBS.

Figura 3. Croqui dos Experimentos 1 e 2 conduzidos em casa de vegetação.

As plantas foram cortadas, aproximadamente, na altura de 3 cm do solo com o auxílio de lâminas de bisturi estéreis (n°22) e em seguida foram feitas três perfurações em cada planta com o auxílio de agulhas estéreis onde foram depositados 50 µL da células bacterianas em tampão PBS para as plantas de tratamento inoculadas e 50 µL de tampão PBS nas plantas controle (Figura 4) de acordo com instruções descritas por Carvalho (2012). As inoculações ocorreram em outubro/2016 (Exp.1) e em março/2017 (Exp.2) e os colmos foram marcados para coleta futura.

Figura 4. Colmo de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 inoculada com solução tampão PBS + *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Exp.1): (A) Desenvolvimento da planta minutos após a inoculação; e (B) 48h após a inoculação.

A adubação era feita mensalmente com a aplicação de aproximadamente 9,05 g de adubo NPK de formulação 10-10-10 por vaso e a irrigação era diária. Originalmente o Exp.1 contava com duas variedades. Contudo, após a inoculação não houve o desenvolvimento do colmo principal de algumas plantas da variedade SP80-3280, o que reduziu as repetições biológicas dessa variedade. Desta forma, os resultados discutidos adiante do Exp.1 contam apenas com as amostras da variedade CB49-260.

3.2.3. Coleta, extração e armazenamento do caldo de cana-de-açúcar

Os colmos marcados foram coletados 180 dias após a inoculação (DAI), desfibrados em desfibrador (Figura 5 A) e prensados em prensa hidráulica (Figura 5 B). Os caldos obtidos foram filtrados para a eliminação de bagacilhos, armazenados em frascos de polipropileno e acondicionados a -18 ± 2 °C até a realização das análises.

Figura 5. Equipamentos utilizados para a extração do caldo de cana-de-açúcar: (A) Desfibrador Mod. A t 56 a (Arno S.A, Brasil); (B) prensa hidráulica (Codistil, Brasil).

3.2.4. Quantificação e determinação do título bacteriano

3.2.4.1. Extração de DNA em caldo de cana-de-açúcar

Para extração de DNA em caldo de cana-de-açúcar dos Exp.1 e Exp.2, primeiramente 1 mL de caldo foi centrifugado em tubo de *Eppendorf* a 12000 rpm por 5 min a 4 °C, sendo em seguida descartado o sobrenadante, adicionado mais 1 mL de caldo e repetido o processo de centrifugação mais 2 vezes (MATOS et al., 2017). Em seguida, 500 µL do *pellet* foram utilizados para a extração de DNA de acordo com o protocolo de extração descrito por Cia (2014).

Os precipitados foram ressuspensos em 337,5 µL de solução SET (NaCl 75 mM; EDTA 25 mM; Tris-base 20 mM, pH 5,0), com a adição de 1 mg mL⁻¹ de lisozima e incubadas a 37 °C por 2 h. Após este período de incubação, foram adicionados 35 µL de SDS 10% (p/v) contendo 0,5 mg mL⁻¹ de proteinase K e as amostras foram levadas para incubação por 2 h a 55 °C. Em seguida, foram adicionados 125 µL de NaCl 5 M e 375 µL de clorofórmio e as amostras ficaram incubadas durante 30 min a temperatura ambiente (26 ± 1 °C). Após esse período, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 15 min a 4 °C, seus os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e foram adicionados 375 µL de isopropanol gelado em cada amostra.

As amostras ficaram armazenadas por um período de 12 h a -8 °C e em seguidas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitados secos em estufa por 30 min a 37 °C. Após a secagem foram ressuspensos em 200 µL de tampão T₁₀E₁₀ e adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de CTAB 10% (p/v) diluído em NaCl 1 M. As amostras foram aquecidas por 10 min a 65 °C, acrescentados 600 µL de clorofórmio e centrifugadas a 12000 rpm por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado, antes de incubá-los por 2 h a -20 °C.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C e os sobrenadantes foram descartados. Foram feitas duas lavagens dos precipitados com etanol 70% (v/v) gelado, centrifugando sempre após cada lavagem por 10 min a 12000 rpm. Os DNAs foram secos por 30 min em estufa a 37 °C e ressuspensos em 40 µL de água ultrapura autoclavada, contendo RNase (10 µg mL⁻¹).

3.2.4.2. Quantificação e determinação do título bacteriano nos caldos de cana-de-açúcar

Após a extração, o DNA de cada amostra foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (Termo Scientific) e a seguir as concentrações foram ajustadas para 50 ng µL⁻¹ (CIA, 2014; POSPIECH; NEUMANN, 1995). Para determinar o título bacteriano nas amostras de caldo de cana-de-açúcar foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) com um termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG segundo as recomendações do fabricante. As reações de qPCR foram feitas como descrito por Cia (2014) e Carvalho (2012). Para as reações de qPCR foram utilizados 2 µL de DNA 50 ng µL⁻¹, 12,5 µL de tampão de amplificação SuperMix, *primer* 12950F 0,2 × 10⁻⁷ mol L⁻¹, *primer* 12950R 0,2 × 10⁻⁷ mol L⁻¹, padrão de referência interna (ROX) 50 nM e água *Nuclease free* para um volume final de 25 µL. Inicialmente foram feitos 2 ciclos de amplificação, um a 50 °C por 2 min e outro a 95 °C por 5 min e em seguida foram feitos 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 s, anelamento e extensão a 60 °C por 30 s. Uma curva padrão, para correlacionar as diferentes massas de DNA com os valores de Ct (*cycle threshold*), foi feita utilizando os valores conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Correlação entre quantidade de DNA por reação e número de células de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

DNA de Lxx por reação	Células de Lxx
10 ng	3,8x10 ⁶
1 ng	3,8x10 ⁵
0,1 ng	3,8x10 ⁴
0,01 ng	3,8x10 ³
0,001 ng	380
0,0001 ng	38

3.2.5. Análises tecnológicas do caldo de cana-de-açúcar

3.2.5.1. Peso do bolo úmido

O peso do bolo úmido (PBU) foi obtido segundo as normas ABNT NBR 16221 e 16271 (CONSECANA, 2015), onde o peso deve ser aferido em balança de precisão com menor divisão de 0,1 g.

3.2.5.2. Sólidos solúveis do caldo

A determinação de sólidos solúveis do caldo de cana-de-açúcar (brix%caldo) foi realizada de acordo com a Norma ABNT NBR 16223 (CONSECANA, 2015), por leitura direta do caldo utilizando um refratômetro de bancada (Bellingham + Stanley Ltd., Reino Unido), previamente calibrado com água destilada.

3.2.5.3. Porcentagem em massa de sacarose aparente

Para a quantificação da porcentagem em massa de sacarose aparente (pol%caldo), foram utilizados dois tipos de polarímetros e dois agentes clarificantes, as análises foram feitas segundo as normas NBR 16224 e 16271 (CONSECANA, 2015).

Para as amostras de caldo de cana-de-açúcar do Exp. 1, foi utilizado um polarímetro modelo ADS 420 saccharimeter, Bellingham + Stanley Ltd. e uma mistura a base de alumínio como agente clarificante. Primeiramente foi feita a conversão da leitura sacarimétrica com a mistura clarificante à base de alumínio (LAL) para leitura equivalente em subacetato de chumbo (LPd) através da Equação 1 e em seguida foi calculado o valor de pol%caldo de acordo com a Equação 2. Para o Exp. 2 foi utilizado um polarímetro rotacional (disco) modelo WXG-4 com tubo de 100 mm e clarificante SUGARPOL. O valor de pol%caldo também foi calculado através da Equação 2, mas neste caso, LPd foi calculada através da Equação 3.

$$LPb = 1,00621 \times LAL + 0,05117 \quad (1)$$

Onde,

LPd: Leitura sacarimétrica obtida a base de subacetato de chumbo

LAL: Leitura sacarimétrica obtida através da mistura clarificante a base de alumínio.

$$Pol\%caldo = LPb \times (0,2605 - 0,0009882 \times Brix) \quad (2)$$

$$LPb = 1,00621 \times LSU + 0,5117 \quad (3)$$

Onde,

LPd: Leitura sacarimétrica obtida a base de subacetato de chumbo

LSU: Leitura sacarimétrica obtida com clarificante SUGARPOL

3.2.5.4. Pureza aparente do caldo

A pureza aparente do caldo (Q) foi calculada (Equação 4) segundo a Norma ABNT NBR 16271 (CONSECANA 2015):

$$Q = (Pol\%caldo \div Brix\%caldo) \times 100 \quad (4)$$

3.2.5.5. Açúcares redutores do caldo

Os açúcares redutores do caldo (AR%caldo) foram calculados (Equação 5) segundo a Norma ABNT NBR 16252 (CONSECANA, 2015), onde Q é a pureza do caldo de cana-de-açúcar:

$$AR\%caldo = 3,641 - (0,0343 \times Q) \quad (5)$$

3.2.5.6. Fibra%cana

Os teores de fibra%cana (F) foram calculados (Equação 6) segundo a Norma ABNT NBR 16225 (TANIMOTO) (CONSECANA, 2015), onde PBU é o peso do bolo úmido.

$$F = 0,08 \times PBU + 0,876 \quad (6)$$

3.2.5.7. Pol%cana

A pol%cana (PC) foi determinada de acordo com a Norma ABNT NBR 16271 (CONSECANA, 2015) através da Equação 7, onde F é a fibra%cana e C é o coeficiente utilizado para conversão de pol do caldo em pol de cana calculado de acordo com a Equação 8.

$$Pol\%cana = Pol\%caldo \times (1 - 0,01 \times F) \times C \quad (7)$$

$$C = 1,0313 - 0,00575 \times F \quad (8)$$

3.2.5.8. Açúcares redutores%cana

Os açúcares redutores%cana (ARC) foram determinados de acordo com a Norma ABNT NBR 16271 (CONSECANA, 2015) através da Equação 9, onde F é a fibra%cana e C o coeficiente.

$$ARC = AR\%caldo \times (1 - 0,01 \times F) \times C \quad (9)$$

3.2.5.9. Açúcar total recuperável

O açúcar total recuperável (ATR) (Equação 10) foi determinado de acordo com a Norma ABNT NBR 16271 (CONSECANA, 2015), onde ATR é o teor de açúcar total recuperável, expresso em quilogramas por tonelada de cana (kg/t); $10 \times PC$ é o valor de pol%cana por tonelada de cana; 1,05263 é o coeficiente estequiométrico para a conversão de pol em açúcares redutores; 0,915 é o coeficiente de recuperação, para uma perda industrial de 8,5%; e $10 \times ARC$ é o valor de açúcares redutores%cana por tonelada de cana.

$$ATR = 10 \times PC \times 1,05263 \times 0,915 + 10 \times ARC \times 0,915 \quad (10)$$

3.2.6. Análises físico-químicas do caldo de cana-de-açúcar

3.2.6.1. Turbidez

A determinação da turbidez (COPERSUCAR, 2001) do caldo de cana-de-açúcar foi realizada através de leitura direta com um turbidímetro de bancada Tecnopon TB 1000 (Piracicaba, Brasil), previamente calibrado com padrões fornecidos pela mesma empresa. Os valores de turbidez são expressos em NTU (Unidade Nefelométrica de Turbidez).

3.2.6.2. Cor ICUMSA

A análise de cor ICUMSA foi realizada segundo o método GS2/3-9 (ICUMSA, 2011). Através da determinação dos sólidos solúveis, foi feito o cálculo para a diluição a fim de se obter um brix%caldo de 1,25. As amostras foram filtradas em filtro a vácuo (com membranas de filtro de nitrato de celulose, 0,45 µm, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha) e em seguida realizada a correção do pH para $7,0 \pm 0,05$, utilizado HCl (0,1 N) e NaOH (0,1 N). Em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro (UV-mini 1210, Shimadzu, Japão) à 420 nm com cubeta de quartzo de 1 cm e a leitura do brix%caldo. O índice de cor ICUMSA das amostras foi determinado através das Equações 11 e 12, onde: ABS é a absorbância da amostra lida à 420 nm; BrixC é o valor da leitura de sólidos solúveis na amostra diluída com pH já ajustado; e Brix0 é o valor da leitura de sólidos solúveis na amostra original. Os valores foram expressos em unidade ICUMSA (U.I.).

$$Cor\ ICUMSA\ (420\ nm) = \left[\frac{ABS \times 1000}{densidade \times \frac{BrixC}{100}} \right] \quad (11)$$

$$densidade = 1 + \left(\left(Brix0 \times \frac{200 + BrixC}{5400} \right) \times \left(\frac{BrixC}{Brix0} \right) \right) \quad (12)$$

3.2.6.3. Fenólicos totais

Os teores de fenólicos totais (JULKUNEN-TIITTO, 1985) foram determinados utilizando uma alíquota de 1 mL de caldo de cana-de-açúcar misturado com 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (1:10, v/v), preparado no instante da análise. A solução permaneceu por 40 min em repouso e a seguir houve a adição de 2,5 mL de carbonato de sódio 20% (m/v). As soluções foram homogeneizadas e lidas à 725 nm em espectrofotômetro (UV-mini 1210, Shimadzu, Japão) com cubeta de quartzo de 1 cm. Para a curva de calibração foi utilizada uma solução de ácido tânico em água destilada (0,1 mg mL⁻¹).

3.2.6.4. Flavonóides totais

Para a determinação de flavonóides totais (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970) foram misturados 0,5 mL de caldo de cana-de-açúcar, 4,3 mL de etanol 70% (v/v), 0,1 mL de cloreto de alumínio a 2% (m/v) e 0,1 mL de acetato de sódio 1 M. As soluções foram

homogeneizadas e mantidas em repouso à temperatura ambiente (26 ± 1 °C) por 40 min. Após o tempo de reação foi aferida a absorbância à 415 nm em espectrofotômetro UV Mini-1240 (UV-mini 1210, Shimadzu, Japão). Para a curva de calibração foi utilizada uma solução de rutina em etanol 70% (p/v) ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$).

3.2.7. Análise da cromaticidade do caldo de cana-de-açúcar

Amostras de caldo de cana-de-açúcar do Exp.2 foram analisadas em espectrorradiômetro CAS-140 (Konica Minolta Sensing Americas, Instrument Systems). Através do espectrorradiômetro é medida o fluxo de radiação eletromagnética refletida por uma amostra ou material. A quantidade de energia refletida será um resultado da diferença entre a quantidade de energia (a qual incide através do sol ou de uma lâmpada) absorvida pela amostra ou material e da quantidade de energia transmitida. O espectrorradiômetro foi operado com comprimentos de onda visível da luz (380 a 770 nm) e os padrões utilizados foram utilizados o padrão iluminante D65 e o observador 10°. Para a realização das leituras foi utilizada uma cubeta de plástico ($45 \times 12,5 \times 12,5$ mm) e como branco, água destilada. Cada amostra de caldo de cana-de-açúcar foi avaliada três vezes consecutivas e, em seguida, as medidas colorimétricas foram estabelecidas através de suas médias. Os parâmetros do espaço de cor CIELAB (L^* , a^* , b^* ; C^*_{ab} e h_{ab}) foram obtidos diretamente do espectrorradiômetro, conforme descrito por Gordillo et al. (2012). A distância entre dois pontos no espaço tridimensional (ΔE^*_{ab}) definidos por L^* , a^* e b^* foram calculadas para definir as diferenças de cor (Equação 13).

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (13)$$

O parâmetro L^* indica a luminosidade e é representado pelo eixo vertical do espaço de cor CIELAB. Seus pontos extremos são o negro absoluto, representado pelo 0, e o branco representado por 100. As coordenadas cromáticas são representadas pelos eixos a^* e b^* . A coordenada a^* vai de vermelho (extremidade do eixo positiva) até verde (extremidade do eixo negativa), enquanto que, a coordenada b^* compreende do amarelo (extremidade do eixo positiva) até o azul (extremidade do eixo negativa). A tonalidade (h_{ab}) é o ângulo calculado entre as coordenadas a^* e b^* e define o tom da cor. O croma (C^*_{ab}) é estimado pela distância entre o ponto e a origem dos eixos a^* e b^* (GORDILLO et al., 2015; OGANDO, 2019) (Figura 6).

Figura 6. Coordenadas do espaço de cor CIELAB (L^* , a^* , b^*). Fonte: Konica Minolta

3.2.8. Quantificação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de ultra performance

A extração de compostos fenólicos foi realizada de acordo com Ogando (2019), com 1 mL de caldo de cana-de-açúcar (amostras provenientes do Exp. 2) previamente acidificado com HCl (37% p/v) até se obter pH 2. Para a extração foram utilizados cartuchos com preenchimento de polipropileno (XAD-2 Purified Clean - SPE Tube; Supelco) e metanol como eluente. Em seguida, o material foi seco em rotaevaporador e adicionados 500 μ L de água ultrapura e 500 μ L de acetato de etila. O material foi homogeneizado em ultrassom e centrifugado por 5 min a $17970 \times g$ para coletar os sobrenadantes. Entre o procedimento de secagem em rotaevaporador e a coleta do sobrenadante foram realizadas três repetições. Em seguida, o sobrenadante foi seco em evaporador rotativo e o extrato ressuscitado com 200 μ L de metanol e filtrado com filtros de porosidade de 0,45 μ m antes das suas injeções no sistema de cromatografia líquida de ultra performance.

A quantificação dos ácidos fenólicos e flavonóides com baixo peso molecular foram realizadas por cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*), em duplicata, utilizando um sistema Agilent 1290 com detector de arranjo de diodos (DAD). A coluna utilizada foi uma C₁₈ Eclipse Plus 120 (Agilent, 1,8 μ m, 50 $\times$ 2,1 mm) a 20 °C. A fase móvel era composta de ácido fórmico e água ultrapura na proporção de 0,01% (A) e acetonitrila (B). O gradiente linear era de: 0-5 min: 100% A; 5-20 min: 95% de A-5% de B; 20 a 22 min: 50% A-50% de B; 22 min: lavagem e reequilíbrio da coluna. O volume de injeção foi de 1 μ L e a taxa de fluxo foram 0,7 mL min⁻¹. Curvas de calibração foram feitas para 20 compostos fenólicos diferentes em concentrações de 0,5 a 12,5 mg L⁻¹ (OGANDO, 2019).

3.2.9. Análise estatística

Os resultados obtidos nos Itens 3.2.4, 3.2.5 e 3.2.6 foram submetidos ao teste F da análise de variância e suas médias comparadas através do Teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o software R (R CORE TEAM, 2019). Enquanto que os dados obtidos nos Itens 3.2.7 e 3.2.8 foram avaliados pelo software Statistica versão 8.0 (STATSOFT, 2007). Neste caso, as correlações entre as concentrações de Lxx com parâmetros do espaço de cor CIELAB e com a quantificação dos compostos fenólicos foram estudadas por regressões simples calculadas através de Modelos Lineares Gerais (GLM) e as diferenças significativas foram consideradas para $p < 0,05$.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Quantificação do título bacteriano e validação do experimento

A técnica de qPCR é a mais precisa para a quantificação e detecção da Lxx, uma vez que consegue constatar a presença da bactéria em baixas quantidades (CARVALHO, 2012; GRISHAM; PAN; RICHARD JR., 2007). Os valores obtidos para a quantificação dos títulos de Lxx, nas amostras de caldo de cana-planta com 180 DAI, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração de título bacteriano ($\times 10^6$ de células bacterianas/ μL de caldo de cana) para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em amostras de caldo de cana-planta, das variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária) com 180 DAI

Experimento	Variedade	Tratamento	Título Bacteriano ($\times 10^6$ de células bacterianas/ μL de caldo de cana)
Exp.1	CB49-260	Inoculada	$0,49^a \pm 0,14$
Exp.1	CB49-260	Controle	$0,04^b \pm 0,02$
Exp.2	SP80-3280	Inoculada	$0,13^a \pm 0,00$
Exp.2	SP80-3280	Controle	$0,07^b \pm 0,01$
Exp.2	CB49-260	Inoculada	$0,53^a \pm 0,22$
Exp.2	CB49-260	Controle	$0,06^b \pm 0,01$

Médias seguidas de letras diferentes dentro do mesmo experimento, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

A quantificação de Lxx foi feita com o objetivo de distinguir os dois grupos de amostras (controle e inoculadas) em ambos os experimentos. Visivelmente as plantas inoculadas não se diferenciavam das plantas controles em ambos os experimentos. Comstock e Lentini (2005) alegam

que algumas variedades de cana-de-açúcar tendem a não apresentar sintomas externos e internos que são relacionados ao RSD, o que dificulta o diagnóstico do RSD.

As amostras inoculadas em todos os experimentos, apresentam títulos de Lxx superiores as amostras controles e em ambos os experimentos houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Além disso, através dos dados obtidos por qPCR foi possível observar que as amostras inoculadas da variedade CB49-260 apresentaram títulos de Lxx superiores as amostras inoculadas de SP80-3280, confirmando a suscetibilidade da variedade CB49-260 já descrita na literatura. Ros (2004) categorizou variedades de cana-de-açúcar de acordo com a resistência ao RSD e obteve que a variedade CB49-260 apresentou 76% de vasos do xilema colonizados, sendo considerada suscetível a doenças, enquanto que a variedade SP80-3280 teve aproximadamente 20%, sendo classificada como de resistência intermediária ao RSD. Gagliardi (2008) também comprovou a suscetibilidade da variedade CB49-260, contudo, essa classificação foi relacionando aos maiores danos na produtividade. Moretti (2017) confirmou a suscetibilidade da CB49-260, uma vez que, a variedade apresentou títulos de Lxx oito vezes maiores do que a variedade SP80-3280 e as plantas controles.

Apesar das amostras do grupo controle não terem sido inoculadas com Lxx, também foram detectados títulos de Lxx, ainda que baixos, nessas amostras. A presença de Lxx em amostras do grupo controle já foi relatada em outros trabalhos (CARVALHO, 2012; CIA, 2014; GRISHAM; PAN; RICHARD JR., 2007; MORETTI, 2017).

Alguns autores alegam que não há nenhuma cultivar de cana-de-açúcar imune ao RSD e consideram que a Lxx possa estar presente em todas as cultivares brasileiras de cana-de-açúcar. Contudo, algumas cultivares tendem a ser mais resistentes do que outras, o que faz com que haja uma menor multiplicação da bactéria e menores danos aparentes nas plantas (DAVIS; DEAN; HARRISON, 1988; GILLASPIE; TEAKLE, 1989a; JAMES; OLIVARES, 1998; WEAVER; TEAKLE; HAYWARD, 1977).

A Lxx é uma bactéria endofítica e no geral, todas as plantas possuem microrganismos endofíticos que adentram na estrutura vegetal através de aberturas naturais e/ou feridas. Em plantas perenes e semi-perenes, como é o caso da cana-de-açúcar, a entrada desses microrganismos ocorre principalmente durante o período de colheita. Muitas vezes esses microrganismos vivem no interior do hospedeiro sem causar danos aparentes, o que acaba diferenciando-os de microrganismos fitopatogênicos (AZEVEDO, 1998).

3.3.2. Análises tecnológicas do caldo de cana-de-açúcar

A qualidade da matéria-prima impacta diretamente o desempenho industrial (DOJAS; BATISTA; MARQUES, 2009). Quanto maior for a pureza, melhor será a qualidade da matéria-prima para a recuperação do açúcar. A pureza é uma relação determinada pelos valores de pol%caldo e brix%caldo. A pol%caldo representa o teor de sacarose aparente e o brix é determinado pela leitura dos sólidos solúveis em caldo. Para a indústria canavieira, quanto mais elevados os teores de sacarose, melhor (AMORIM et al., 2004; BET, 2015). Os valores obtidos para brix%caldo, pol%caldo e pureza estão detalhados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de brix%caldo, pol%caldo e pureza (%), determinados segundo o Manual Consecana, para caldo de cana-planta, das variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária) com 180 DAI

Experimento	Variedade	Tratamento	Brix%caldo	Pol%caldo	Pureza (%)
Exp.1	CB49-260	Inoculada	7,85 ^a ± 0,51	3,48 ^a ± 0,79	43,45 ^a ± 6,51
Exp.1	CB49-260	Controle	6,97 ^b ± 0,22	2,04 ^b ± 0,85	29,54 ^b ± 2,60
Exp.2	SP80-3280	Inoculada	6,05 ^a ± 0,27	0,60 ^a ± 0,07	9,69 ^a ± 0,85
Exp.2	SP80-3280	Controle	5,68 ^a ± 0,33	0,56 ^a ± 0,17	9,56 ^a ± 2,28
Exp.2	CB49-260	Inoculada	7,46 ^a ± 0,34	1,37 ^a ± 0,05	18,16 ^a ± 1,79
Exp.2	CB49-260	Controle	6,95 ^b ± 0,28	0,64 ^b ± 0,05	9,59 ^b ± 0,30

Médias seguidas de letras diferentes dentro do mesmo experimento, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Plantas inoculadas com Lxx apresentaram maiores porcentagens de brix%caldo, pol%caldo e pureza comparadas as amostras controles, sendo que, apenas a variedade CB49-260 apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) entre os seus tratamentos. Gagliardi (2008) comparou os índices de brix%caldo e pol%caldo, da variedade CB49-260, de cana-planta em quatro tratamentos distintos (controle, baixa, média e alta concentração de inóculo de Lxx) e observou que não houve diferença estatística entre os tratamentos tanto para brix%caldo, quanto para pol%caldo. Outros autores não obtiveram diferenças estatísticas entre os tratamentos quando avaliaram o impacto da Lxx nos teores de brix%caldo em cana-planta para outras variedades (ROUSSEL; CORCODEL, 2010; SILVA, 2015; ZHANG et al., 2016b).

De acordo com Azevedo (1981), o acúmulo de sacarose acontece à medida que a cana-de-açúcar amadurece e ao mesmo tempo que ocorre uma diminuição dos açúcares redutores (frutose e glicose). Devido ao pouco tempo de cultivo (180 dias), as plantas não atingiram o estágio

de maturação ideal para colheita, o que justifica os valores baixos obtidos para pol%caldo e pureza, inferiores aos recomendados por Ripoli & Ripoli (2004) ($>14\%$ e $>85\%$, respectivamente). Estudos relacionando a qualidade do caldo de cana-de-açúcar e o impacto do RSD na literatura ainda são pouco difundidos. A Lxx é uma bactéria endofítica que promove o entupimento dos vasos do xilema. A obstrução dos vasos pode acabar comprometendo a circulação de água para os tecidos da planta, o que provavelmente promove uma concentração dos sólidos solúveis no colmo (CARNEIRO-JUNIOR, 2006; MATSUOKA, 1984; TEAKLE; APPLETON; STEINDL, 1978). Desta forma, a maior incidência de Lxx pode não ser responsável por um aumento na produção de açúcar na cana-de-açúcar, mas sim pode ter provocado uma concentração dos sólidos solúveis contidos no colmo.

Outros parâmetros importantes para a qualidade da matéria-prima são, a quantidade de açúcares redutores e o teor de fibra. Os açúcares redutores%cana representam a quantidade de glicose e frutose presentes na cana-de-açúcar, podendo afetar diretamente a pureza do caldo e refletir em uma menor capacidade de recuperação da sacarose. Em relação a fibra, no campo, quanto maior o teor de fibra menos suscetível a cana-de-açúcar está a quebra, o que favorece para que não haja deterioração e perdas de sacarose, contudo, um alto teor de fibra impacta diretamente na eficiência de extração do caldo na indústria. A quantidade de açúcar total recuperável (ATR) é determinada através do cálculo da pol%cana e dos açúcares redutores da cana (ARC), além de ser parâmetro para o sistema de pagamento da cana-de-açúcar no estado de São Paulo (AMORIM et al., 2004; RIPOLI; RIPOLI, 2004). Os valores obtidos para ARC, fibra%cana e ATR estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de ARC (%), fibra%cana e ATR (Kg/ton), determinados segundo o Manual Consecana, para caldo de cana-planta, das variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária) com 180 DAI

Experimento	Variedade	Tratamento	ARC (%)	Fibra%cana	ATR (Kg/ton)
Exp.1	CB49-260	Inoculada	2,10 ^b ± 0,22	5,30 ^a ± 1,10	49,25 ^a ± 4,28
Exp.1	CB49-260	Controle	2,59 ^a ± 0,11	6,83 ^a ± 1,65	38,70 ^b ± 1,34
Exp.2	SP80-3280	Inoculada	2,95 ^a ± 0,09	8,34 ^a ± 1,76	31,72 ^a ± 0,62
Exp.2	SP80-3280	Controle	2,92 ^a ± 0,10	9,02 ^a ± 1,09	31,46 ^a ± 0,86
Exp.2	CB49-260	Inoculada	2,56 ^a ± 0,14	9,52 ^a ± 0,62	36,63 ^a ± 1,71
Exp.2	CB49-260	Controle	2,77 ^a ± 0,27	9,67 ^a ± 0,96	34,53 ^a ± 4,05

Médias seguidas de letras diferentes dentro do mesmo experimento, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

As amostras inoculadas da variedade CB49-260 apresentaram menores porcentagens de ARC, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) apenas no Exp. 1, enquanto que para a variedade SP80-3280, as amostras inoculadas tiveram a maior porcentagem de ARC, porém sem diferença estatística entre seus tratamentos.

Monteiro-Vitorello (2004) sequenciaram o genoma da estirpe CTC B07, a mesma utilizada neste estudo, de Lxx e observaram que esta possui vários genes que estão envolvidos na ingestão de açúcar, o que a torna capaz de utilizar uma grande variedade de carboidratos, incluindo arabinose, frutose, galactose, glicerol, glicose, lactose, maltose, maltotriose, ribose, trepadeira e xilose. Rosa (2006) testou diversas fontes de carbono em meio de cultura próprio para o crescimento de Lxx e observou que a maior taxa de crescimento ocorreu com a adição de glicose. No entanto, não há explicações do porquê a taxa de crescimento de Lxx tende a ser maior na presença da glicose como fonte de carbono. Desta forma, a menor concentração de ARC nas amostras inoculadas da variedade padrão suscetível (CB49-260) pode ter ocorrido devido ao consumo da glicose pela ação da bactéria para o seu crescimento, isso pode ainda ser justificado pelo fato que a variedade mais resistente (SP80-3280) inoculada, que possuía uma menor concentração de Lxx, apresentou maiores índices ARC.

Alguns trabalhos relacionam alterações nos teores de açúcares redutores (AR) nos caldos de cana-de-açúcar com outras doenças. O aumento nos teores de AR já foram relatados em canas-de-açúcar com sintomas de síndrome do amarelecimento foliar (FONTANIELLA et al., 2003) e cigarrinha-das-raízes (MADALENO et al., 2008). Enquanto que, reduções de AR foram relatadas por Ravaneli et al. (RAVANELI et al., 2011) para a cigarrinha-das-raízes e por Mukunthan e colaboradores (2008) associada a presença de pulgão-lanoso da cana-de-açúcar (*Ceratovacuna lanigera* Zehntner). Os açúcares redutores não apresentam cor, contudo na presença de aminoácidos e em altas temperaturas, induzem as reações de Maillard, promovendo a formação de melanoidinas, compostos que favorecem a formação de cor (GODSHALL., 1996; OGANDO, 2019; SARTORI, 2017).

A fibra%cana foi menor em todas as amostras inoculadas e em nenhum dos casos houve diferença estatística, mostrando que a Lxx não afetou no teor de fibra neste caso. Gagliardi (2008) também não observou diferença estatística entre os diferentes tratamentos com Lxx para cana-planta, da variedade CB49-260.

O ATR foi maior nas amostras inoculadas, mas apenas a variedade CB49-260 cultivada no Exp.1 apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Bailey & Bechet (1986) avaliaram os impactos causados pela RSD em oito variedades de cana-planta e em cinco delas houve um aumento no percentual de ATR. Grisham e colaboradores (2009) observaram um

aumento nos teores de ART em seis de nove variedades de cana-planta, porém sem diferença estatística entre os tratamentos. Muitos autores já relataram que o impacto da doença tende a ser baixo ou quase inexistente em cana-planta (RICAUD et al., 1989; SHARMA, 2006; YOUNG; BRUMBLEY, 2004; YOUNG, 2016; ZEKARIAS et al., 2012).

3.3.3. Análises físico-químicas do caldo de cana-de-açúcar

Além dos parâmetros tecnológicos, outros fatores são importantes e podem refletir na qualidade do açúcar produzido, como a turbidez e a cor ICUMSA. Altos valores para turbidez do caldo refletem na qualidade final dos cristais de açúcar e podem impactar na durabilidade dos equipamentos (OGANDO et al., 2019; SILVA; SARTORI; AGUIAR, 2015). Assim como a turbidez, a cor ICUMSA do caldo reflete na produção do açúcar, uma vez que grande parte da coloração do açúcar final é proveniente do caldo (LIONNET, 1992; SARTORI, 2017). Os valores obtidos para cor ICUMSA e turbidez estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de cor ICUMSA (U.I.) e turbidez (NTU) para caldo de cana-planta, das variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária) com 180 DAI

Experimento	Variedade	Tratamento	Cor ICUMSA (U.I.)	Turbidez (NTU)
Exp.1	CB49-260	Inoculada	23806,73 ^b ± 943,24	859 ^a ± 37,71
Exp.1	CB49-260	Controle	33095,19 ^a ± 845,95	827 ^a ± 18,00
Exp.2	SP80-3280	Inoculada	34496,36 ^b ± 653,90	461 ^a ± 20,25
Exp.2	SP80-3280	Controle	46859,21 ^a ± 718,40	432 ^a ± 33,28
Exp.2	CB49-260	Inoculada	26251,91 ^b ± 456,76	475 ^a ± 35,18
Exp.2	CB49-260	Controle	32870,27 ^a ± 959,66	447 ^a ± 36,29

Médias seguidas de letras diferentes dentro do mesmo experimento, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Amostras inoculadas com Lxx apresentaram os menores índices de cor ICUMSA, e em todos os casos houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Em relação a turbidez, as amostras inoculadas tiveram maiores teores, contudo não houve diferença estatística entre os tratamentos. Apesar de serem parâmetros importantes para a produção de açúcar, os estudos relacionando o impacto de pragas e doenças nos teores de cor ICUMSA e turbidez do caldo ainda são poucos divulgados. Ingram et al (1951) relataram que a broca da cana-de-açúcar tende a deixar a cor do caldo mais escura e aumentar a turbidez devido a lesão da broca.

Reações enzimáticas envolvendo compostos fenólicos podem contribuir para o escurecimento do caldo (NGUYEN; DOHERTY, 2011). Além disso, compostos fenólicos que permanecem no caldo mesmo após o processo de tratamento do caldo tendem a afetar a qualidade do açúcar produzido (OGANDO et al., 2019; PAYET; SING; SMADJA, 2006). Os valores obtidos para fenólicos e flavonóides totais estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de fenólicos totais (g L⁻¹) e flavonóides totais (g L⁻¹) para caldo de cana-planta, das variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária) com 180 DAI

Experimento	Variedade	Tratamento	Fenólicos totais (g L ⁻¹)	Flavonóides totais (g L ⁻¹)
Exp.1	CB49-260	Inoculada	0,133 ^a ± 0,0	0,680 ^a ± 0,14
Exp.1	CB49-260	Controle	0,144 ^a ± 0,01	0,722 ^a ± 0,17
Exp.2	SP80-3280	Inoculada	0,130 ^a ± 0,01	0,677 ^a ± 0,07
Exp.2	SP80-3280	Controle	0,156 ^b ± 0,01	0,690 ^a ± 0,19
Exp.2	CB49-260	Inoculada	0,159 ^a ± 0,02	0,510 ^a ± 0,19
Exp.2	CB49-260	Controle	0,199 ^a ± 0,02	0,550 ^a ± 0,08

Médias seguidas de letras diferentes dentro do mesmo experimento, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

As amostras inoculadas apresentaram menores concentrações de fenólicos totais e flavonóides totais. Contudo, apenas a variedade SP80-3280 apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) entre os seus tratamentos para fenólicos totais e para flavonóides totais, nenhuma variedade apresentou diferença estatística entre os tratamentos. Nenhuma diferença significativa de fenólicos totais foi observada em caldo de cana-de-açúcar com Lxx por Roussel e Corcodel (2010).

Amostras controles de ambas as variedades apresentaram as maiores concentrações de fenólicos totais, flavonóides totais e os maiores índices para cor ICUMSA (Tabela 5). A presença de ácidos fenólicos e flavonóides em caldo de cana-de-açúcar é muito associado ao aumento na cor no caldo e do açúcar produzido (CAMPIONIOL et al., 2018, 2019; MANDRO et al., 2015; OGANDO et al., 2019; PATON, 1992b, 1992a; SARTORI; MAGRI; AGUIAR, 2015; SILVA; SARTORI; AGUIAR, 2015; SMITH et al., 1981; SMITH; PATON, 1985).

A quantificação de fenólicos totais em caldo de cana-de-açúcar foi realizada através do método colorimétrico com reagente Folin-Ciocalteu. Neste método, há a reação de redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico presentes no reagente Folin-Ciocalteu em solução alcalina, devido a adição do carbonato de sódio. Esse método é um dos mais utilizado para quantificar os compostos fenólicos totais em alimentos. No entanto, o método não pode ser considerado

específico para detecção dos fenólicos totais, uma vez que outras substâncias redutoras na amostra, como por exemplo os açúcares redutores, também podem formar o ânion fenolato, o qual é responsável por reduzir os ácidos presentes no reagente e formar os óxidos molibdênio e tungstênio, complexos que têm coloração azul e são detectáveis a 765 nm (MILENE ANGELO; JORGE, 2006)

De maneira geral, o aumento de compostos fenólicos em folhas e caldo de cana-de-açúcar geralmente está associado a altos danos causados por doenças, aumento nas infestações e na presença de patógenos. Ravaneli et al. (2011) e Madaleno et al. (2008) verificaram um aumento na concentração de fenólicos totais pela infestação da cigarrinha-das-raízes, enquanto que, Fontaniella et al. (2003) observaram um aumento associado a maiores sintomas da síndrome do amarelecimento.

A Lxx pode ser considerada um microrganismo endofítico cuja patogenicidade depende da concentração de bactéria nos tecidos vegetais e de fatores bióticos e abióticos que controlam a sua multiplicação no hospedeiro (BAILEY, 1997; CIA et al., 2018; MCFARLANE, 2002; ZEKARIAS et al., 2012). Devido ao ambiente controlado (temperatura e umidade controladas, irrigações e adubações periódicas), ao pouco tempo de cultivo (6 meses) e ao fato das plantas serem cana-planta, as amostras mesmo quando inoculadas com Lxx apresentavam uma baixa concentração bacteriana, o que pode ter influenciado em uma menor resposta da planta a inoculação, fato que influenciou nas menores concentrações de fenólicos e flavonóides totais em amostras inoculadas.

3.3.4. Análise da cromaticidade do caldo de cana-de-açúcar

O estudo de cor do caldo de cana-de-açúcar através da metodologia de cor ICUMSA, já é amplamente relatado na literatura (MAGRI et al., 2019; OGANDO et al., 2019; RODRIGUES; SPERANDIO; ANDRADE, 2017; SARTORI, 2017; SARTORI; MAGRI; AGUIAR, 2015; SILVA; SARTORI; AGUIAR, 2015). Contudo, Ogando (2019) afirma que trabalhos relacionando o estudo da colorimetria através do espaço de cor CIELAB e a cor do caldo de cana-de-açúcar ainda são incomuns. A avaliação da cor do caldo de cana-de-açúcar, através da metodologia ICUMSA permite apenas avaliar se duas ou mais amostras diferem numericamente entre si. Já a análise por cromaticidade permite comparar a coloração de amostras e objetos através de vários parâmetros. Então mesmo que duas ou mais amostras aparentam ter a mesma coloração, através da avaliação dos parâmetros do espaço de cor CIELAB, as amostras podem ser distinguidas umas das outras em relação a sua luminosidade, saturação e tonalidade. Desta forma, com o objetivo de apresentar

uma avaliação mais completa da cor do caldo de cana-de-açúcar em relação a presença da Lxx a coloração das amostras foi determinada pelo espaço de cor CIELAB e os valores obtidos para as coordenadas L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} e h_{ab} estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Coordenadas de cores CIELAB (e desvio padrão) obtidas para caldo de cana-planta das variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária) e seus tratamentos (inoculado e controle)

	CB49-260		SP80-3280	
	Inoculada	Controle	Inoculada	Controle
L^*	41.21 ± 1.90	32.39 ± 3.97	31.72 ± 0.55	29.14 ± 0.89
a^*	14.74 ± 1.14	17.05 ± 1.48	15.49 ± 1.13	16.56 ± 2.39
b^*	32.75 ± 3.87	25.94 ± 5.63	24.38 ± 4.65	21.96 ± 1.94
C^*_{ab}	35.92 ± 3.99	31.09 ± 5.46	28.93 ± 4.52	27.52 ± 2.92
h_{ab}	65.68 ± 1.02	56.13 ± 3.64	57.16 ± 3.17	53.11 ± 2.01

As amostras inoculadas apresentaram os maiores valores de L^* , C^*_{ab} , h_{ab} , indicando que essas eram mais claras e vivas do que suas respectivas amostras controles (Tabela 7). Já as amostras inoculadas de CB49-260 apresentaram valores mais altos para L^* , C^*_{ab} e h_{ab} , indicando que essas amostras eram as mais claras, mais coloridas (brilhantes, vivas) e mais próximas do amarelo ($h_{ab} = 90^\circ$) dentre todas as amostras (Tabela 7).

Dentro do plano CIELAB, todas as amostras ficaram dispostas no primeiro quadrante do plano (a^*b^*), o que representa valores positivos para a^* e b^* na região vermelho-amarelo (Figura 7). A presença de amostras de caldo de cana-de-açúcar no primeiro quadrante (0 a 90°) já foi relatada anteriormente em outros trabalhos de classificação da cor do caldo através dos parâmetros CIELAB (BOMDESPACHO et al., 2018; OGANDO et al., 2019). A presença de pigmentos naturais é um dos principais fatores para a classificação das amostras de caldo de cana-de-açúcar no primeiro quadrante, que compreende a região vermelho (0°) a amarelo (90°). Muitos compostos naturalmente presentes na cana-de-açúcar passam a fazer parte do caldo devido o processo de extração e acabam por contribuir para a coloração do caldo (CLARKE; BLANCO; GODSHALL., 1984; SMITH; PATON, 1985). Os compostos polifenólicos, derivados dos ácidos cinâmico e benzoico, por exemplo, possuem colorações que variam de incolor a amarelo, enquanto os flavonóides incluem um vasto grupo de compostos que estão na faixa do amarelo e as antocianinas conferem a cor avermelhada (GODSHALL., 1996).

Para obter uma definição mais completa da cor por meio das coordenadas obtidas no CIELAB, é necessário ainda avaliar as coordenadas angulares (L^* , h_{ab} e C^*_{ab}) ou escalares (L^* , a^* e

b^*) separadamente (HERNANZ et al., 2008). A Tabela 8 apresenta a relação entre os tratamentos (inoculado e controle) e suas coordenadas angulares. Para essa avaliação, as coordenadas angulares: luminosidade (L^*), tonalidade (h_{ab}) e croma (C^*_{ab}) foram consideradas variáveis independentes e as concentrações bacterianas, descritas na Tabela 2, variáveis dependentes.

Tabela 8. Valores de R^2 obtidos a partir de modelos de regressão simples, para o estudo da relação entre os tratamentos, inoculado com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (I) e controle (C), e as coordenadas angulares (L^* , h_{ab} , C^*_{ab}), para as variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária) †

	CB49-260	SP80-3280
L^* <i>h_{ab}</i> <i>C^*_{ab}</i>	<i>0.91</i>	<i>0.99</i>

†Efeitos significativos ($p < 0,05$) estão representados em itálico

As coordenadas angulares apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos para ambas as variedades, mostrando que a presença da Lxx interfere nesses parâmetros de cor. Para a variedade CB49-260, o parâmetro que teve maior impacto na distribuição das amostras no espaço de cor CIELAB foi a tonalidade (h_{ab}), o que contribuiu para uma boa distribuição entre os dois grupos de amostras (controle e inoculado) dessa variedade (Figura 8). Já para a variedade SP80-3280, a coordenada luminosidade (L^*) foi a que teve maior importância na distribuição das amostras, não sendo possível distinguir os grupos (controle e inoculado), além disso, por apresentaram uma tonalidade menor que as amostras da variedade CB49-260 as amostras ficaram mais distantes do ângulo de 90° (Figura 9).

Figura 7. Plano CIELAB (a^*b^*) para amostras de caldo de cana-planta das variedades CB49-260 e SP80-3280 inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (I) e controle (C).

Figura 8. Plano CIELAB (a^*b^*) para amostras de caldo de cana-planta das variedades CB49-260 inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (I) e controle (C).

Figura 9. Plano CIELAB (a^*b^*) para amostras de caldo de cana-planta das variedades SP80-3280 inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (I) e controle (C).

3.3.5. Quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de ultra eficiência

Os compostos fenólicos são responsáveis pela produção de vários compostos antimicrobianos que desempenham um papel importante nas respostas de defesa das plantas (SANTIAGO et al., 2009). Além disso, os ácidos fenólicos, naturalmente presentes na cana-de-açúcar, são os compostos que mais afetam a cor do caldo de cana-de-açúcar (BUCHELI; ROBINSON, 1994; CLARKE; LEGENDRE, 1999; PATON, 1992a, 1992b; PATON; DUONG, 1992a, 1992b; PATON; DUONG; BARTLETT, 1992). Os ácidos fenólicos que foram quantificados por cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC), estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Concentração (mg L⁻¹), desvio padrão e R² de compostos fenólicos quantificados em amostras de caldo de cana-planta das variedades CB49-260 (suscetível) e SP80-3280 (resistência intermediária), para os tratamentos inoculado com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (I) e controle (C)

Classe de Compostos Fenólicos	Compostos Fenólicos	CB49-260			SP80-3280		
		I (mg L ⁻¹)	C (mg L ⁻¹)	R ²	I (mg L ⁻¹)	C (mg L ⁻¹)	R ²
Ácidos Benzóicos (C6-C1)	Ácido Cinâmico	ND*	0,02 ± 0	0,07	0,06 ± 0	0,03 ± 0	0,29
	Ácido Gálico	ND*	0,01 ± 0	0,15	0,07 ± 0	0,05 ± 0,1	0,37
	Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzóico	0,24 ± 0,1	0,19 ± 0	0,03	1,70 ± 0,5	0,88 ± 0,8	-0,02
	Ácido Vanílico	0,41 ± 0,2	0,65 ± 0,2	0,25	3,28 ± 0,1	2,76 ± 0,6	0,05
	Ácido Sirínico	0,25 ± 0,2	0,07 ± 0	0,58	0,35 ± 0,1	0,28 ± 0,1	-0,01
Ácidos Hidroxicinâmicos (C6-C3)	Ácido Caféico	0,01 ± 0	0,03 ± 0	0,01	ND*	ND*	ND
	Ácido <i>p</i> -Cumárico	0,47 ± 0,2	0,31 ± 0,1	0,41	0,92 ± 0,1	0,64 ± 0,2	0,09
	Ácido Ferúlico	0,06 ± 0,1	0,04 ± 0,1	-0,03	0,20 ± 0	0,34 ± 0,2	-0,09
Flavonas	Apigenina	0,35 ± 0,1	ND*	0,49	0,07 ± 0,1	0,18 ± 0,2	-0,04
	Isoorientina	0,96 ± 0,6	0,42 ± 0,2	0,11	0,16 ± 0,1	0,02 ± 0	0,95
	Vitexina	0,18 ± 0,2	0,05 ± 0	0,20	0,12 ± 0,1	0,08 ± 0,1	0,71
Flavonóis	Rutina	0,23 ± 0,1	0,11 ± 0	0,16	0,07 ± 0	0,16 ± 0,2	-0,05
Flavanonas	Naringina	0,12 ± 0,1	0,09 ± 0	0,30	0,10 ± 0	0,05 ± 0,1	0,27

†Valores de R² foram obtidos a partir de modelos de regressão simples, para o estudo da relação dos tratamentos e o conteúdo de compostos fenólicos em cada variedade de cana-de-açúcar. Efeitos significativos ($p < 0,05$) estão indicados em itálico.

*ND: Não detectado

Os compostos fenólicos quantificados puderam ser classificados em cinco grupos distintos: ácidos benzóicos (ácido cinâmico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido *p*-hidroxibenzóico), ácidos hidroxicinâmicos (ácido caféico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico), flavonas (apigenina, isoorientina, vitexina), flavonóis (rutina) e flavanonas (naringina). A variedade CB49-260 apresentou as maiores concentrações de flavonas, flavonóis e flavanonas, enquanto que, a variedade SP80-3280 apresentou as maiores concentrações para ácidos benzóico e hidroxicinâmico (Tabela 9).

A relação entre os tratamentos e o conteúdo de compostos fenólicos nas variedades (R^2) foi avaliada a partir de modelos de regressão simples, os efeitos que foram significativos ($p < 0,05$) estão indicados em *itálico* na Tabela 9. Para a variedade CB49-260 foi observado diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos para o ácido vanílico, ácido sirínico, ácido *p*-cumárico, vitexina e naringina. Já para a variedade SP80-3280 houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos para os ácidos cinâmico e gálico, isoorientina, vitexina e naringina.

A classificação das amostras de CB49-260 inoculadas, mais próximas do ângulo de 90° (amarelo) no espaço de cor CIELAB (Figura 8) pode ter ocorrido devido a maior concentração flavonas e flavanonas, uma vez que muitas delas apresentam coloração amarela (Figura 8).

A identificação de ácidos fenólicos e flavonóides da cana-de-açúcar já é amplamente descrita na literatura. No caldo de cana-de-açúcar já foram relatadas as presenças do ácido gálico (OGANDO et al., 2019; ZHAO et al., 2008), ácido protocatecuico (OGANDO et al., 2019; PAYET; SING; SMADJA, 2006; ZHAO et al., 2008), do ácido *p*-hidroxibenzóico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; PAYET; SING; SMADJA, 2006; ZHAO et al., 2008), ácido vanílico (NGUYEN; DOHERTY, 2011; OGANDO et al., 2019; ZHAO et al., 2008), ácido clorogênico (NGUYEN; DOHERTY, 2011; ZHAO et al., 2008), ácido caféico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; NGUYEN; DOHERTY, 2011; PAYET; SING; SMADJA, 2006; ZHAO et al., 2008), ácido sirínico (OGANDO et al., 2019; PAYET; SING; SMADJA, 2006; ZHAO et al., 2008), ácido cumárico, ácido ferúlico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2011; NGUYEN; DOHERTY, 2011; OGANDO et al., 2019; PAYET; SING; SMADJA, 2006; ZHAO et al., 2008), ácido sinapínico (ZHAO et al., 2008), vitexina (COLOMBO; LANÇAS; YARIWAKE, 2006; VILA et al., 2008), apigenina (DUARTE-ALMEIDA et al., 2011) e naringenina (OGANDO et al., 2019).

Uma análise discriminante foi aplicada para diferenciar as variedades com base nas classes de compostos fenólicos presentes em cada uma (Figura 10).

Figura 10. Análise discriminante das variedades CB49-260 e SP80-3280 em função dos compostos fenólicos quantificados por UHPLC.

A classificação apresentou uma separação das variedades satisfatória com altos níveis de significância ($p < 0,001$). Os compostos fenólicos responsáveis por separar a variedade CB49-260 foram a isoorientina, vitexina, apigenina e naringina, já no caso da variedade SP80-3280 a separação da variedade foi promovida pela presença dos ácidos vanílico, cinâmico, *p*-hidroxibenzóico, sirínico, gálico e ferúlico.

Coutinho et al. (2016) obtiveram uma separação satisfatória entre as mesmas variedades estudadas devido ao perfil de compostos fenólicos presentes nas folhas, observando que um dos fatores que permitiu uma maior separação da variedade resistente foram os altos níveis de ácido ferúlico.

Além de uma boa separação entre as variedades, ainda é possível observar que houve uma boa segregação entre os tratamentos para a variedade SP80-3280. Muitos compostos fenólicos participam de rotas sintéticas de defesa das plantas, como ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sirínico, os quais são sintetizados a partir da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) na via da síntese de fenilpropanóide. A atividade da enzima PAL é essencial para manter os níveis desses fenólicos nas plantas em geral (SANTIAGO et al., 2009). No caso da cana-de-açúcar Cia e colaboradores (2018) observaram que a inoculação de Lxx, em plantas variedade SP80-3280, favoreceu uma regulação positiva de genes que estão relacionados à produção da enzima PAL, o que pode ser uma possível rota de resposta ativada na interação da cana-de-açúcar com a bactéria. A maior presença desses ácidos fenólicos envolvidos em mecanismos de defesa das plantas, pode

estar relacionada a maior resistência da variedade ao RSD, uma vez que há uma menor taxa de crescimento da Lxx nessa variedade como apresentado na Tabela 2.

3.4. Conclusão

A presença da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* não reduziu a qualidade do caldo de cana-planta, uma vez que amostras inoculadas apresentaram, maiores valores para brix%caldo, pol%caldo, pureza e açúcares totais recuperáveis que são considerados bons indicativos para a indústria. A menor concentração de açúcares redutores nas amostras inoculadas da variedade suscetível pode estar relacionada ao consumo da glicose como fonte de carbono pela bactéria para o seu desenvolvimento. As amostras inoculadas apresentaram ainda maior luminosidade e croma, indicando que eram mais claras e brilhantes do que os controles. As tonalidades em ambas as variedades foram muito próximas, fazendo com que todas as amostras fossem classificadas no primeiro quadrante que denomina a região de coloração de vermelho-amarelo no espaço de cor CIELAB. Cinco classes de compostos fenólicos puderam ser quantificadas nas amostras de caldo de cana-planta, sendo que a variedade CB49-260 apresentou as maiores concentrações de flavonas, flavonóis e flavanonas, o que pode ter influenciado na classificação das mesmas amostras no espaço de cor CIELAB, próximo do amarelo (90°). Já a variedade de resistência moderada SP80-3280, apresentou as maiores concentrações de ácidos benzóico e hidroxicinâmico, que são ácidos fenólicos envolvidos em processos de defesa das plantas.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V. et al. Qualidade da Cana-de-Açúcar e seu Impacto na Indústria. In: RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C. (Eds.). **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. 1. ed. Piracicaba: Barros e Marques Editoração Eletrônica, 2004. p. 185–193.
- AZEVEDO, H. J. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Araras: Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-Açúcar, 1981.
- BAILEY, R. A.; BECHET, G. R. Effect of ratoon stunting disease on the yield and components of yield of sugarcane under rainfed conditions. **Proceedings of the South African Sugar Technologist's Association**, v. 60, p. 143–147, 1986.
- BAILEY, R. A.; MCFARLANE, S. A. The incidence and effects of ratoon stunting disease of sugarcane in southern and central Africa. **Proc. Int. Soc. Sug. Cane Technol**, v. 73, p. 338–345, 1999.
- BAILEY, R.; BECHET, G. The effect of ratoon stunting disease on the yield of some South African sugarcane varieties under irrigated and rainfed conditions. **Proceedings of The South African Sugar Technologists' Association**, n. June, p. 74–78, 1995.
- BET, J. A. **Indutores de maturação e a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar**. 2015. 1125 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo, 2015.
- BRUMBLEY, S. M. et al. Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 6, p. 681–689, 2006.
- BUCHELI, C. S.; ROBINSON, S. P. Contribution of enzymic browning to color in sugarcane juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 257–261, 1994.
- CARNEIRO-JUNIOR, J. B. **Efeito do tratamento térmico e da inoculação de bactérias endofíticas no controle do raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar**. 2006. 92 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006.
- CARVALHO, G. DE. **Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras**. 2012. 144 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2012.
- CIA, M. C. **Análise transcritômica de plantas de cana de açúcar inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo das soqueiras**. 2014. 105 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2014.

- CIA, M. C. et al. Novel insights into the early stages of ratoon stunting disease of sugarcane inferred from transcript and protein analysis. **Genetics and Resistance**, v. 108, p. 1455–1466, 2018.
- CLARKE, M. A.; BLANCO, R. S.; GODSHALL, M. A. **Color tests and other indicators of raw sugar refining characteristics**. Sugar Processing Research Conference. **Anais...**New Orleans: 1984
- CLARKE, M. A.; LEGENDRE, B. R. Qualidade da cana-de-açúcar: Impactos no rendimento do açúcar e fatores da qualidade. **Soc. Tec. Açúc. Alco. Bras., Açúc. Alco. Subprod.**, v. 17, n. 6, p. 36–40, 1999.
- COLOMBO, R. et al. On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid chromatography-UV detection using post-column derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1082, p. 51–59, 2005.
- COLOMBO, R.; LANÇAS, F. M.; YARIWAKE, J. H. Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 1, p. 118–124, 2006.
- COMSTOCK, J. C. Sugarcane yield loss due to ratoon stunt. **Journal Association Sugar Cane Technologists**, v. 28, n. 1990, p. 22–31, 2008.
- CONSECANA. **Manual de instruções CONSECANA-SP**. 6. ed. Piracicaba: CONSECANA-SP, 2015.
- COPERSUCAR. Métodos Analíticos. In: COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA. (Ed.). **Manual de controle químico da fabricação de açúcar**. Piracicaba: [s.n.]. 2001. 57 p.
- COUTINHO, I. D. et al. Metabolite profiling of sugarcane genotypes and identification of flavonoid glycosides and phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 21, p. 4198–4206, 2016.
- COYAGO-CRUZ, E. et al. Antioxidants (carotenoids and phenolics) profile of cherry tomatoes as influenced by deficit irrigation, ripening and cluster. **Food Chemistry**, v. 240, p. 870–884, 2018.
- DE ANNUNZIO, F. R. et al. Comparação entre o método ICUMSA e colorimétrico para medição da cor do açúcar. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 30, n. 4, p. 36–40, 2012.
- DEAN, J. L.; DAVIS, M. J. Losses caused by ratoon stunting disease of sugarcane in Florida. **American Society of Sugar Cane Technology**, v. 10, n. 18, p. 66–72, 1990.
- DOJAS, F.; BATISTA, V. L.; MARQUES, M. O. Qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de açúcar. **Nucleus**, v. Ed. Especial, p. 59–66, 2009.

- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, n. 4, p. 187–192, 2006.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) products. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 660–664, 2011.
- EGGLESTON, G. et al. Improved control of sucrose losses and clarified juice turbidity with lime saccharate in hot lime clarification of sugarcane juice and other comparisons with milk of lime. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 1, p. 311–325, 2014.
- FERREIRA, M. D.; SPRICIGO, P. C. Colorimetria - Princípios e aplicações na agricultura. In: FERREIRA, M. D. (Ed.). **Instrumentação Pós-colheita em Frutas e Hortaliças**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2017. p. 209–220.
- FONTANIELLA, B. et al. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 11–12, p. 1027–1036, nov. 2003.
- GAGLIARDI, P. R. **Avaliação da resistência à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-da-soqueira (RSD), em variedades comerciais de cana-de-açúcar**. 2008. 119 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
- GODSHALL, M. A. Recent progress in sugar colourants: GC-MS. **Proceedings of the South African Sugar Technologist's Association**, v. 70, p. 153–161, 1996.
- GORDILLO, B. et al. Comprehensive colorimetric study of anthocyanic copigmentation in model solutions. Effects of pH and molar ratio. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 2896–2905, 2012.
- GORDILLO, B. B. et al. Application of differential colorimetry to evaluate anthocyanin–flavonol–flavanol ternary copigmentation interactions in model solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7645–7653, 2015.
- GRISHAM, M. P.; JOHNSON, R. M.; VIATOR, R. V. Effect of ratoon stunting disease on yield of recently released sugarcane cultivars in Louisiana. **Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists**, v. 29, p. 119–127, 2009.
- GRISHAM, M. P.; PAN, Y.-B.; RICHARD JR., E. P. Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. **Plant Disease**, v. 91, n. 4, p. 430–434, 2007.
- HERNANZ, D. et al. Multivariate statistical analysis of the color–anthocyanin relationships in different soilless-grown strawberry genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2735–2741, 2008.

- ICUMSA. Method G.S. 2/3-9. The determination of sugar solution colour at 7.0 – Accepted. In: **International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis**. 2011.
- INGRAM, J. W. et al. **Pests of sugarcane and their control - Circular No. 878**. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=VhIB4LSbqakC&oi=fnd&pg=PA2&dq=%3Cturbidity+sugarcane+disease%3E&ots=AODRNpYW0e&sig=gCF2eRLI0jr6PXR4rs5CGwoXIV0#v=onepage&q=turbidity&f=false>>. Acesso em: 2 jun. 2020.
- JR. ROSSATO, J. A. **Manejo de pragas é essencial para garantir a produtividade dos canaviais**. Disponível em: <<https://blog.strider.ag/manejo-de-pragas-e-essencial-para-garantir-produtividade-dos-canaviais/>>. Acesso em: 3 jun. 2020.
- JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: Methods for the analysis of certain phenolics. **J. Agric. Food Chem.**, v. 33, n. 2, p. 213–217, 1985.
- KAZEEM, S. A.; IKOTUN, B. Effect of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* on growth and yield of sugarcane in Nigeria. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, n. 3, p. 587–595, 2019.
- LIONNET, G. R. E. The effect of some selected factors on the colour in cane. **Proceedings of The South African Sugar Technologists Association**, p. 121–126, jun. 1992.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. Reagents and procedures for the ultraviolet spectral analysis of flavonoids. In: **The Systematic Identification of Flavonoids**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1970. p. 35–40.
- MADALENO, L. L. et al. Influence of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) injury on the quality of cane juice. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 68–73, 2008.
- MAGRI, N. T. C. et al. Precipitation of nonsugars as a model of color reduction in sugarcane juice (*Saccharum* spp.) submitted to the hydrogen peroxide clarification of the crystal sugar process. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 10, out. 2019.
- MATSUOKA, S. Longevidade do efeito do tratamento térmico em canas infectadas pelo raquitismo da soqueira. **Summa Phytopathologica**, v.2, p.57-59, 1984.
- MATTOS, E. et al. Molecular detection of *Trypanosoma cruzi* in acai pulp and sugarcane juice. **Acta Tropica**, v. 176, p. 311–315, 2017.
- MONTEIRO-VITTORELLO, C. B. et al. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 17, n. 8, p. 827–836, 2004.
- MORETTI, F. R. R. DE C. **Identification of candidate resistance metabolites to *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane through metabolomic profiling**. 2017. 128 f. Tese

- (Doutorado em International Plant Cell and Molecular Biology) - “Luiz de Queiroz” College of Agriculture, 2017.
- MUKUNTHAN, N. et al. Assessment of woolly aphid impact on growth, yield and quality parameters of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 10, n. 2, p. 143–149, 2008.
- NGUYEN, D.; DOHERTY, W. Phenolics in sugar cane juice: Potential degradation by hydrogen peroxide and fenton’s reagent. **Proc Aust Soc Sugar Cane Technol**, v. 33, p. 1–10, 2011.
- OGANDO, F. I. B. **Aplicação da eletrocoagulação na purificação e clarificação do caldo de cana-de-açúcar**. 2019. 138 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2019.
- OGANDO, F. I. B. et al. Removal of phenolic, turbidity and color in sugarcane juice by electrocoagulation as a sulfur-free process. **Food Research International**, v. 122, p. 643–652, jan. 2019.
- PATON, N. H. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part I. Determination of chlorogenic acid and other phenolics in sugar cane by HPLC. **International Sugar Journal**, v. 94, p. 99–108, 1992a.
- PATON, N. H. The origin of colour in raw sugar. **Proc. Australian Soc. Sugarcane Technol.**, v. 14, p. 8–17, 1992b.
- PATON, N. H.; DUONG, M. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part II. Concentration of phenolics in sugar cane and colour of first expressed juice. **International Sugar Journal**, v. 1124, p. 170–176, 1992a.
- PATON, N. H.; DUONG, M. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part III. Role of chlorogenic acid and flavonoids in enzymic browning of cane juice. **International Sugar Journal**, v. 94, n. 1124, p. 170–176, 19 jul. 1992b.
- PATON, N. H.; DUONG, M.; BARTLETT, M. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part IV. Statistical relationships between concentration of chlorogenic acid and flavonoids in cane, colour of cane extracts and colour of first expressed juice. **International Sugar Journal**, v. 94, n. 1125, p. 205–210, 1992.
- PAYET, B.; SING, A. S. C.; SMADJA, J. Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7270–7276, 20 set. 2006.
- POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. **Trends in Genetics**, v. 11, n. 6, p. 217–218, 1995.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing, 2019.

- RAVANELI, G. C. et al. Spittlebug impacts on sugarcane quality and ethanol production. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46, n. 2, p. 120–129, 2011.
- RICAUD, C. et al. **Diseases of sugarcane - Major diseases**. Amsterdam: ELSEVIER SCIENCE BV, 1989.
- RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Piracicaba: Barros e Marques Editoração Eletrônica. 1 ed. 2004. p. 185-193.
- RODRIGUES, R.; SPERANDIO, L. C. C.; ANDRADE, C. M. G. Investigation of color and turbidity in the clarification of sugarcane juice by ozone. **Journal of Food Process Engineering**, v. 41, n. 1221, p. 1–11, 2017.
- ROS, P. B. **Avaliação da resistência de variedades de cana-de-açúcar ao raquitismo-da-soqueira com base na taxa de colonização dos colmos por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2004. 58 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica das Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
- ROUSSEL, C.; CORCODEL, L. Evaluation of a reunionese variety infected by ratoon stunting disease. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol**, v. 27, p. 1–6, 2010.
- SANTIAGO, R. et al. Changes in phenolic acids content, phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in sugarcane leaves induced by elicitors isolated from *Xanthomonas albilineans*. **Australasian Plant Pathology**, v. 38, n. 4, p. 357–365, 2009.
- SARTORI, J. A. DE S. **Qualidade físico-química da cana-de-açúcar e microbiológica do caldo sobre o processo de ozonização do caldo na redução sustentável da cor ICUMSA e impurezas vegetais**. 2017. 128 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2017.
- SARTORI, J. A. DE S.; MAGRI, N. T. C.; AGUIAR, C. L. DE. Clarificação de caldo de cana-de-açúcar por peróxido de hidrogênio: Efeito da presença de dextrana. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 299–306, 2015.
- SHARMA, P. D. Diseases Caused by Bacteria and Mollicutes. In: SHARMA, P. D. (Ed.). **Plant Pathology**. [s.l.] Alpha Science, 2006. p. 700.
- SILVA, F. L. S. DA. **Efeitos de estresse bióticos sobre os parâmetros ecofisiológicos e componentes de produção de quatro variedades de cana-de-açúcar**. 2015. 69 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal do Sergipe, 2015.
- SILVA, W. S.; SARTORI, J. A. DE S.; AGUIAR, C. L. Combination effect of ozone and heat treatment for the color reduction in sugarcane juice. **Chemical and Process Engineering Research**, v. 35, p. 75–84, 2015.

- SMITH, P.; PATON, N. H. Sugarcane flavonoids. **Sugar Technology Reviews**, v. 12, p. 117–142, 1985.
- STATSOFT. **Statistica for Windons Software**. Tulsa: Statsoft Inc., 2007.
- TEAKLE, D. S. S.; APPLETON, J. M.; STEINDL, D. R. L. R. L. An anatomical basis for resistance of sugar cane to ratoon stunting disease. **Physiological Plant Pathology**, v. 12, n. 1, p. 83–91, jan. 1978.
- TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. F. A. (Eds.). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Vol 2. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. p. 219–231.
- VEIGA, F. M. Notas sobre o raquitismo das socas em Campos. **Brasil Açucareiro**1, v. 47, n. 1, p. 81–83, 1956.
- VILA, F. C. et al. HPLC microfractionation of flavones and antioxidant (radical scavenging) activity of *Saccharum officinarum* L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 903–908, 2008.
- YOUNG, A.; BRUMBLEY, S. M. Ratoon stunting disease of sugarcane: History, management and new research. In: RAO, G. P.; SAUMTALLY, S.; ROTT, P. (Eds.). **Sugarcane pathology. Vol. III: Bacterial and nematode diseases**. 3rd. ed. Enfield: Science Publishers, 2004. p. 97–124.
- YOUNG, A. J. et al. Genetic uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 503–511, 2006.
- YOUNG, A. J. Possible origin of ratoon stunting disease following interspecific hybridization of *Saccharum* species. **Plant Pathology**, v. 65, n. 9, p. 1403–1410, 2016.
- YOUNG, A. J. The Invisible Disease. **Plant Disease**, v. 102, p. 473–482, 2018.
- ZEKARIAS, Y. et al. Effect of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* concentration on yields of four sugarcane varieties in the sugarcane plantations of Ethiopia. **Ethiopian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 25–30, 2012.
- ZHANG, X. Q. et al. Influence of inoculation of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* on photosynthetic parameters and activities of defense enzymes in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 19, n. 4, p. 1–8, 2016.
- ZHAO, Z.-G. et al. Simultaneous determination of ten major phenolic acids in sugarcane by a reversed phase HPLC method. **Sugar Industry**, v. 133, n. August 2014, p. 1–7, 2008.

4. EFEITO DO RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS NA QUALIDADE E CARACTERÍSTICAS DO CALDO DE CANA-SOCA

RESUMO

O ciclo produtivo da cana-de-açúcar permite em média até cinco cortes e com o passar do tempo o rendimento do canavial tendem a diminuir, o que somado a outros fatores, como a suscetibilidade da variedade a determinadas pragas e doenças, pode reduzir a qualidade da matéria-prima e impactar negativamente na produção de açúcar. O raquitismo das soqueiras é uma doença causada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) que acomete a cultura da cana-de-açúcar, encurtando os entrenós e afinando os colmos, além disso, os sintomas tendem a ser mais expressivos a cada nova rebrota do canavial. Desta forma, o objetivo foi avaliar o impacto do raquitismo das soqueiras nas características do caldo de cana-soca da variedade CB49-260, suscetível a doença. A avaliação do caldo de cana-de-açúcar foi feita através de análises tecnológicas, físico-químicas e da quantificação dos açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A detecção e quantificação dos títulos bacterianos foi realizada por PCR em tempo real e as amostras com sintomas aparentes da doença apresentaram maiores concentrações de títulos bacterianos, diferindo estatisticamente, das amostras sem sintomas aparentes da doença. O grupo de amostras contendo as maiores concentrações de Lxx apresentou resultados estatisticamente maiores para brix%caldo, pol%caldo, açúcares redutores%cana (ARC), fibra%cana, açúcares totais recuperáveis (ATR), turbidez e fenólicos totais. A cor ICUMSA e os flavonóides totais não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. A quantificação de açúcares por HPLC mostrou que amostras com alto títulos de Lxx tiveram as maiores concentrações de sacarose, frutose e glicose, sendo que entre os açúcares redutores, as concentrações de glicose foram as mais baixas. Essa menor concentração pode ter ocorrido devido ao consumo da glicose como fonte de carbono para o crescimento da Lxx. Apesar de apresentar as maiores concentrações de sacarose, açúcar de maior interesse industrial, a menor porcentagem de pureza aparente do caldo, a maior concentração de açúcares redutores e de compostos fenólicos totais podem influenciar negativamente na produção e na recuperação de açúcar.

Palavras-chave: Análises Físico-Químicas; Glicose; Açúcares Redutores; HPLC.

ABSTRACT

The sugarcane production cycle allows an average of up to five cuts and, over time, the yield of the cane field tends to decrease, which in addition to other factors such as the susceptibility of the variety to certain diseases, can reduce the quality raw material and negatively impact sugar production. Ratoon stunting is a disease caused by the bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) that affects the culture of sugarcane, causing thinner stalks and shorter internodes, in addition, the symptoms tend to be more expressive with each new regrowth of the cane field. Thus, the objective was to evaluate the impact of ratoon stunting disease on the characteristics of the ratoon cane

juice of the CB49-260 variety, susceptible to disease. The evaluation of the sugarcane juice was made through technological, physical-chemical analyzes and sugar quantification by high performance liquid chromatography (HPLC). The detection and quantification of bacterial titers was performed by real-time PCR and samples with apparent symptoms of the disease showed higher concentrations of bacterial titers, differing statistically from samples without apparent symptoms of the disease. The group of samples containing the highest concentrations of Lxx showed statistically higher results for brix%juice, pol%juice, reducing sugars% sugarcane (RSS), fiber%cane, total recoverable sugars (TRS), turbidity and total phenolics. The ICUMSA color and the total flavonoids didn't show statistical difference between treatments. The quantification of sugars by HPLC showed that samples with high Lxx titers had the highest concentrations of sucrose, fructose and glucose, and among the reducing sugars, the glucose concentrations were the lowest. This lower concentration may have occurred due to the consumption of glucose as a carbon source for the growth of Lxx. Despite having the highest concentrations of sucrose, sugar of greatest industrial interest, the lowest percentage of apparent purity in the juice, the highest concentration of reducing sugars and total phenolic compounds can negatively influence sugar production and recovery.

Keywords: Physicochemical Analysis; Glucose; Reducing Sugars; HPLC.

4.1. Introdução

A cana-de-açúcar é uma planta de ciclo semi-perene, desta forma, após a colheita dos colmos não há a necessidade de realizar um novo plantio, pois através do sistema radicular, ocorre a regeneração da soqueira dando início a um novo ciclo de germinação da planta (DE AQUINO et al., 2015; MOORE; PATERSON; TEW, 2014; VITTI et al., 2007). O primeiro ciclo que corresponde do plantio até o primeiro corte corresponde a cana-planta, enquanto que, os ciclos de regeneração subsequentes podem ser descritos na literatura como soca, soqueira, ou cana-soca. No geral, um ciclo de uma cana-planta pode durar de 14 a 18 meses, enquanto que, para cana-soca pode ser de até 12 meses (MARCHIORI, 2004).

A produtividade de um canavial pode ser, em média, de até cinco cortes, sendo uma colheita de cana-planta e mais quatro de cana-soca. Essa duração pode variar de acordo com a variedade e a qualidade da muda plantada, condições de plantio e colheita, condições climáticas, características do solo, do trato cultural e outros (MARCHIORI, 2004). O desenvolvimento da planta acontece sob altas condições de temperatura, luminosidade e água (MOORE; PATERSON; TEW, 2014). Após a colheita do último ciclo é necessário realizar a renovação do canavial. A renovação pode ser feita a partir de um novo plantio de cana-de-açúcar ou então com o plantio de outra cultura que não a cana-de-açúcar, processo que é conhecido como rotação de cultura. A rotação de cultura é realizada com o objetivo de fazer o controle de plantas daninhas e pragas,

conservar o solo e aumentar a produtividade da cana-de-açúcar que será plantada (BOLONHEZI; PEREIRA, 1999).

É comum que ocorra uma redução gradual na produtividade da cana-de-açúcar a cada corte (MARCHIORI, 2004). Além disso, a presença de pragas e doenças tende a reduzir ainda mais a produtividade do canavial, além de prejudicar a obtenção de açúcar (RIPOLI; RIPOLI, 2004).

O raquitismo das soqueiras (RSD) é uma doença que acomete a cultura da cana-de-açúcar e é causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). A transmissão da doença pode ocorrer através da contaminação do instrumento de corte ou então pelo plantio do material de propagação vegetativa (tolete) já infectado (YOUNG, 2018). O RSD diminui a produtividade agrícola e impacta negativamente na quantidade de cortes em um canavial, quando altamente infectado, devido ao comprometimento do crescimento das plantas (PORTO; DE ALMEIDA; CALSA JUNIOR, 2016; ROSA, 2006).

Outras doenças características da cultura da cana-de-açúcar, além do RSD, que também podem ser disseminadas através do uso de toletes contaminados são: o mosaico da cana-de-açúcar (*Vírus* - “SCMV”), a escaldadura-das-folhas (*Xanthomonas albilineans*) e o carvão da cana-de-açúcar (*Sporisorium scitamineum*) (RICAUD et al., 1989; SILVA, 2013; URASHIMA; ZAVAGLIA, 2012). A maioria das doenças características da cultura de cana-de-açúcar apresenta sintomas bem específicos o que facilita os seus diagnósticos. No entanto, os sintomas associados ao RSD podem passar despercebidos muitas vezes por não serem muito expressivos, o que acaba favorecendo a transição e plantio de toletes infectados e promove a disseminação da doença para outras regiões (PORTO; DE ALMEIDA; CALSA JUNIOR, 2016; URASHIMA; ZAVAGLIA, 2012).

Desta forma, o objetivo foi avaliar o impacto da presença da bactéria de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* no caldo de cana-soca da variedade CB49-260, suscetível a doença, através de análises tecnológicas, físico-químicas e quantificação de açúcares (sacarose, frutose e glicose) por cromatografia líquida de alta eficiência.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Coleta, extração e armazenamento do caldo de cana-de-açúcar

As amostras de cana-de-açúcar utilizadas neste capítulo foram coletadas no Centro de Cana em Ribeirão Preto/SP do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). A variedade utilizada foi a CB49-260 que é suscetível ao RSD. O plantio das gemas ocorreu no IAC em 26 de fevereiro de 2015. O repasse para vasos (50 L) foi realizado 46 dias após o plantio e a inoculação ocorreu

em 03 de julho. Os vasos foram preenchidos com 25 kg de substrato (Bioplant), 25 kg de terra e adubo NPK 8-28-16. Após 30 dias foi feita a adubação com NPK 20-5-20. A estufa onde eram mantidos os vasos ficava sem controle de temperatura e umidade.

A coleta foi realizada em fevereiro de 2017 e os colmos foram divididos em dois grupos, “com sintomas aparentes da doença” e “sem sintomas aparentes da doença” (Figura 11). Em seguida para a obtenção do caldo, os colmos foram desfibrados em desfibrador (Figura 12 A) e prensados em prensa hidráulica (Figura 12 B). Os caldos obtidos foram filtrados para a eliminação de bagacilhos, armazenados em frascos de polipropileno e acondicionados a $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até a realização dos ensaios experimentais.

Figura 11. Colmos despontados de cana-de-açúcar da variedade CB49-260, com e sem sintomas de RSD. A esquerda das imagens colmos “com sintomas aparentes da doença” e a direita colmos “sem sintomas aparentes da doença”.

Figura 12. Equipamentos utilizados para a extração do caldo de cana-de-açúcar: (A) Desfibrador Mod. A t 56 a (Arno S.A, Brasil); (B) prensa hidráulica (Codistil, Brasil).

4.2.2. Quantificação e determinação do título bacteriano

4.2.2.1. Extração de DNA em caldo de cana-de-açúcar

Para extração de DNA em caldo de cana-de-açúcar, primeiramente 1 mL de caldo foi centrifugado em tubo de *Eppendorf* a 12000 rpm por 5 min a 4 °C, sendo em seguida descartado o sobrenadante, adicionado mais 1 mL de caldo e repetido o processo de centrifugação mais 2 vezes (MATTOS et al., 2017). Em seguida, 500 µL do *pellet* foram utilizados para a extração de DNA de acordo com o protocolo de extração descrito por Cia (2014).

Os precipitados foram ressuspensos em 337,5 µL de solução SET (NaCl 75 mM; EDTA 25 mM; Tris-base 20 mM, pH 5,0), com a adição de 1 mg mL⁻¹ de lisozima e incubadas a 37 °C por 2 h. Após este período de incubação, foram adicionados 35 µL de SDS 10% (p/v) contendo 0,5 mg mL⁻¹ de proteinase K e as amostras foram levadas para incubação por 2 h a 55 °C. Em seguida, foram adicionados 125 µL de NaCl 5 M e 375 µL de clorofórmio e as amostras ficaram incubadas durante 30 min a temperatura ambiente (26 ± 1 °C). Após esse período, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 15 min a 4 °C, seus os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e foram adicionados 375 µL de isopropanol gelado em cada amostra.

As amostras ficaram armazenadas por um período de 12 h a -8 °C e em seguidas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitados secos em estufa por 30 min a 37 °C. Após a secagem foram ressuspensos em 200 µL de tampão T₁₀E₁₀ e adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de CTAB 10% (p/v) diluído em NaCl 1 M. As amostras foram aquecidas por 10 min a 65 °C, acrescentados 600 µL de clorofórmio e centrifugadas a 12000 rpm por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado, antes de incubá-los por 2 h a -20 °C.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C e os sobrenadantes foram descartados. Foram feitas duas lavagens dos precipitados com etanol 70% (v/v) gelado, centrifugando sempre após cada lavagem por 10 min a 12000 rpm. Os DNAs foram secos por 30 min em estufa a 37 °C e ressuspensos em 40 µL de água ultrapura autoclavada, contendo RNase (10 µg mL⁻¹).

4.2.2.2. Quantificação e determinação do título bacteriano nos caldos de cana-de-açúcar

Após a extração, o DNA de cada amostra foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (Thermo Scientific) e a seguir as concentrações foram ajustadas para 50 ng µL⁻¹ (CIA, 2014; POSPIECH; NEUMANN, 1995). Para determinar o título bacteriano nas amostras de caldo de cana-de-açúcar foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) com um termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG segundo as recomendações do fabricante. As reações de qPCR foram feitas como descrito por Cia (2014) e Carvalho (2012). Para as reações de qPCR foram utilizados 2 µL de DNA 50 ng µL⁻¹, 12,5 µL de tampão de amplificação SuperMix, *primer* 12950F $0,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, *primer* 12950R $0,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, padrão de referência interna (ROX) 50 nM e água *Nuclease free* para um volume final de 25 µL. Inicialmente foram feitos 2 ciclos de amplificação, um a 50 °C por 2 min e outro a 95 °C por 5 min e em seguida foram feitos 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 s, anelamento e extensão a 60 °C por 30 s. Uma curva padrão, para correlacionar as diferentes massas de DNA com os valores de Ct (*cycle threshold*), foi feita utilizando os valores conforme a Tabela 10.

Tabela 10. Correlação entre quantidade de DNA por reação e número de células de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

DNA de Lxx por reação	Células de Lxx
10 ng	3,8x10 ⁶
1 ng	3,8x10 ⁵
0,1 ng	3,8x10 ⁴
0,01 ng	3,8x10 ³
0,001 ng	380
0,0001 ng	38

4.2.3. Análises tecnológicas do caldo de cana-de-açúcar

4.2.3.1. Peso do bolo úmido

O peso do bolo úmido (PBU) foi obtido segundo as normas ABNT NBR 16221 e 16271 (CONSECANA, 2015), onde o peso deve ser aferido em balança de precisão com menor divisão de 0,1 g.

4.2.3.2. Sólidos solúveis do caldo

A determinação de sólidos solúveis do caldo (brix%caldo) foi realizada de acordo com a Norma ABNT NBR 16223 (CONSECANA, 2015), por leitura direta do caldo utilizando um refratômetro de bancada (Bellingham + Stanley Ltd.), previamente calibrado com água destilada.

4.2.3.3. Porcentagem em massa de sacarose aparente

A quantificação da porcentagem em massa de sacarose aparente (pol%caldo), foi feita segundo as normas NBR 16224 e 16271 (CONSECANA, 2015). Foi utilizado um polarímetro modelo ADS 420 saccharimeter, Bellingham + Stanley Ltd. e uma mistura a base de alumínio como o agente clarificante. Primeiramente foi feita a conversão da leitura sacarimétrica com a mistura clarificante à base de alumínio (LAL) para leitura equivalente em subacetato de chumbo (LPd) através da Equação 1 e em seguida o valor de pol%caldo foi calculado de acordo com a Equação 2.

$$LPb = 1,00621 \times LAL + 0,05117 \quad (1)$$

Onde,

LPd: Leitura sacarimétrica obtida a base de subacetato de chumbo

LAL: Leitura sacarimétrica obtida através da mistura clarificante a base de alumínio.

$$Pol\%caldo = LPb \times (0,2605 - 0,0009882 \times Brix) \quad (2)$$

4.2.3.4. Pureza aparente do caldo

A pureza aparente do caldo (Q) foi calculada (Equação 3) segundo a Norma ABNT NBR 16271 (CONSECANA 2015):

$$Q = (Pol\%caldo \div Brix\%caldo) \times 100 \quad (3)$$

4.2.3.5. Açúcares redutores do caldo

Os açúcares redutores do caldo ($AR\%caldo$) foram calculados (Equação 4) segundo a Norma ABNT NBR 16252 (CONSECANA, 2015), onde Q é a pureza do caldo de cana-de-açúcar:

$$AR\%caldo = 3,641 - (0,0343 \times Q) \quad (4)$$

4.2.3.6. Fibra%cana

Os teores de fibra%cana (F) foram calculados (Equação 5) segundo a Norma ABNT NBR 16225 (TANIMOTO) (CONSECANA, 2015), onde PBU é o peso do bolo úmido.

$$F = 0,08 \times PBU + 0,876 \quad (5)$$

4.2.3.7. Pol%cana

A pol%cana (PC) foi determinada de acordo com a Norma ABNT NBR 16271 (CONSECANA, 2015) através da Equação 6, onde F é a fibra%cana e C é o coeficiente utilizado para conversão de pol do caldo em pol de cana calculado de acordo com a Equação 7.

$$Pol\%cana = Pol\%caldo \times (1 - 0,01 \times F) \times C \quad (6)$$

$$C = 1,0313 - 0,00575 \times F \quad (7)$$

4.2.3.8. Açúcares redutores%cana

Os açúcares redutores%cana (ARC) foram determinados de acordo com a Norma ABNT NBR 16271 (CONSECANA, 2015) através da Equação 8, onde F é a fibra%cana e C o coeficiente.

$$ARC = AR\%caldo \times (1 - 0,01 \times F) \times C \quad (8)$$

4.2.3.9. Açúcar total recuperável

O açúcar total recuperável (ATR) (Equação 9) foi determinado de acordo com a Norma ABNT NBR 16271 (CONSECANA, 2015), onde ATR é o teor de açúcar total recuperável, expresso em quilogramas por tonelada de cana (kg/t), $10 \times PC$ é o valor de pol%cana por tonelada de cana; 1,05263 é o coeficiente estequiométrico para a conversão de pol em açúcares redutores; 0,915 é o coeficiente de recuperação, para uma perda industrial de 8,5% e $10 \times ARC$ é o valor de açúcares redutores%cana por tonelada de cana.

$$ATR = 10 \times PC \times 1,05263 \times 0,915 + 10 \times ARC \times 0,915 \quad (9)$$

4.2.4. Análises Físico-Químicas do caldo de cana-de-açúcar

4.2.4.1. Potencial hidrogeniônico - pH

Para a determinação do pH (COPERSUCAR, 2001) do caldo de cana-de-açúcar, foi utilizado um pHmêtro de bancada Tecnal (pH meter Tec 2), previamente calibrado com padrões 4,0 e 7,0.

4.2.4.2. Turbidez

A determinação da turbidez (COPERSUCAR, 2001) do caldo de cana-de-açúcar foi realizada através de leitura direta com um turbidímetro de bancada Tecnopon TB 1000 (Piracicaba, Brasil), previamente calibrado com padrões fornecidos pela mesma empresa. Os valores de turbidez são expressos em NTU (Unidade Nefelométrica de Turbidez).

4.2.4.3. Cor ICUMSA

A análise de cor ICUMSA foi realizada segundo o método GS2/3-9 (ICUMSA, 2011). Através da determinação dos sólidos solúveis foi feito o cálculo para a diluição a fim de se obter um brix%caldo de 1,25. As amostras foram filtradas em filtro a vácuo (com membranas de filtro de nitrato de celulose, 0,45 µm, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha) e em seguida realizada a correção do pH para $7,0 \pm 0,05$, utilizado HCl (0,1 N) e NaOH (0,1 N). Em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro (UV-mini 1210, Shimadzu, Japão) à 420 nm com cubeta de quartzo de 1 cm e a leitura do brix%caldo. O índice de cor ICUMSA das amostras foi determinado através das Equações 10 e 11, onde: ABS é a absorbância da amostra lida à 420 nm; BrixC é o valor da leitura de sólidos solúveis na amostra diluída com pH já ajustado; e Brix0 é o valor da leitura de sólidos solúveis na amostra original. Os valores foram expressos em unidade ICUMSA (U.I.).

$$Cor\ ICUMSA\ (420\ nm) = \left[\frac{ABS \times 1000}{densidade \times \frac{BrixC}{100}} \right] \quad (10)$$

$$densidade = 1 + \left(\left(Brix0 \times \frac{200 + BrixC}{5400} \right) \times \left(\frac{BrixC}{Brix0} \right) \right) \quad (11)$$

4.2.4.4. Fenólicos totais

Os teores totais de fenólicos (JULKUNEN-TIITTO, 1985) foram determinados utilizando uma alíquota de 1 mL de caldo de cana-de-açúcar misturado com 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (1:10, v/v), preparado no instante da análise. A solução permaneceu por 40 min em repouso e a seguir houve a adição de 2,5 mL de carbonato de sódio 20% (m/v). As soluções foram homogeneizadas e lidas à 725 nm em espectrofotômetro (UV-mini 1210, Shimadzu, Japão) com cubeta de quartzo de 1 cm. Para a curva de calibração foi utilizada uma solução de ácido tânico em água destilada (0,1 mg mL⁻¹).

4.2.4.5. Flavonóides totais

Para a determinação de flavonóides totais (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970) foram misturados: 0,5 mL de amostra, 4,3 mL de etanol 70% (v/v), 0,1 mL de cloreto de alumínio a 2% (m/v) e 0,1 mL de acetato de sódio 1 M. As soluções foram homogeneizadas e mantidas em

repouso à temperatura ambiente (26 ± 1 °C) por 40 min. Após o tempo de reação foi aferida a absorbância à 415 nm em espectrofotômetro UV Mini-1240 (UV-mini 1210, Shimadzu, Japão). Para a curva de calibração foi utilizada uma solução de rutina em etanol 70% (p/v) ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$).

4.2.5. Quantificação de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência

Para a quantificação dos açúcares (sacarose, frutose e glicose) foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de espalhamento de luz evaporativo a baixa temperatura (HPLC/ELSD-LT, Shimadzu). A fase móvel era composta de acetonitrila e água ultrapura na proporção de 7:3 (v/v), previamente filtrados e o volume injetado foi de 1 mL min^{-1} . A coluna usada foi uma NH₂P-50 4E (Shodex Asahipak, $5 \mu\text{m}$, $4,6 \times 250 \text{ mm}$) a 30 °C. O detector foi configurado para trabalhar com temperatura de 35 °C, usando nitrogênio como gás de nebulização à 350 kPa e ganho 3 para análise de sacarose e ganho 7 para análise de glicose e frutose. O volume de injeção das amostras para a quantificação de sacarose foi de $20 \mu\text{L}$ e para a quantificação de glicose e frutose de $5 \mu\text{L}$. Soluções-padrão de sacarose em concentrações de 0 a 30 mg mL^{-1} e de glicose e frutose de 0 a $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ foram utilizadas para a elaboração das curvas de calibração (SHIMADZU APPLICATION NEWS, 2011).

4.2.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância e suas médias comparadas através do Teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o software R (R CORE TEAM, 2019).

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Quantificação do título bacteriano e validação do experimento

A determinação e a quantificação dos títulos bacterianos de Lxx nas amostras de caldos de cana-de-açúcar foram realizadas de forma a confirmar a inoculação realizada pelo IAC. A concentração do título bacteriano das amostras está descrita na Tabela 11.

Tabela 11. Concentração de título bacteriano ($\times 10^6$ de células bacterianas/ μL de caldo de cana) de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em amostras de caldo de cana-soca da variedade CB49-260

Variedade	Tratamento	Título Bacteriano
		($\times 10^6$ de células bacterianas/ μL de caldo de cana-soca)
CB49-260	Alto título	$0,69^a \pm 0,02$
CB49-260	Baixo título	$0,07^b \pm 0,01$

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Através da técnica de qPCR, foi possível separar as amostras de caldo de cana-de-açúcar em dois grupos de acordo com o título bacteriano de cada grupo. O grupo de amostras previamente identificado como “com sintomas aparente do RSD” apresentou maior título de Lxx ($p < 0,05$) do que o grupo “sem os sintomas aparentes do RSD”. Após a quantificação e classificação, os grupos de amostras passaram a ser descritos no trabalho como alto e baixo título, respectivamente.

Mesmo sem ter sido feita a inoculação de Lxx, as amostras consideradas baixo título apresentaram uma pequena concentração de células bacterianas. A presença de Lxx nas amostras não inoculadas pode ser justificada pelo fato da bactéria ser um microrganismo endofítico. Bactérias endofíticas podem ser encontradas em praticamente todas as espécies vegetais e muitas vezes se tendem a se manter em estado de latência, sem causar danos ao hospedeiro (HALLMANN et al., 1997). No caso da Lxx, a patogenicidade depende principalmente da quantidade de bactéria presente nas plantas e da influência de outros fatores abióticos e bióticos (BAILEY, 1997; CIA et al., 2018; MCFARLANE, 2002; ZEKARIAS et al., 2012).

4.3.2. Análises tecnológicas do caldo de cana-de-açúcar

A pol%caldo e a pureza estão entre os fatores de maior importância para aferir a qualidade da cana-de-açúcar. A avaliação do brix%caldo se faz necessária, uma vez que juntamente com a pol%caldo, pode-se determinar a pureza (RIPOLI; RIPOLI, 2004). Um caldo com baixa pureza pode interferir no rendimento de recuperação do açúcar (BOVI; SERRA, 1999). Os valores obtidos para brix%caldo, pol%caldo e pureza estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12. Valores de brix%caldo, pol%caldo e pureza (%), determinados segundo o Manual Consecana, para caldo de cana-soca, com alto e baixo título de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, da variedade CB49-260

Variedade	Tratamento	Brix%caldo	Pol%caldo	Pureza (%)
CB49-260	Alto Título	19,3 ^a ± 0	12,53 ^a ± 0,10	64,93 ^b ± 0,51
CB49-260	Baixo Título	16,1 ^b ± 0	11,69 ^b ± 0,05	72,64 ^a ± 0,32

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

As porcentagens de brix%caldo e pol%caldo foram significativamente ($p < 0,05$) maiores em amostras com alto título de Lxx em relação as amostras com baixo título (Tabela 12). Roussel e Corcodel (2010) observaram um que houve um aumento não significativo ($p < 0,01$) de 4,1% na concentração de açúcar em amostras com as maiores concentrações de Lxx, em variedade suscetível ao RSD. Enquanto que, menores rendimentos de açúcar foram observados por Zekarias et al. (2012) e Kazeen e et al. (2019) em cana-soca, com maiores concentrações de Lxx.

A maturação da cana-de-açúcar é um processo que se inicia com a fotossíntese, ocorrendo nos cloroplastos das células foliares e se desdobrando até o acúmulo dos carboidratos fotossintetizados nos colmos, sendo a sacarose o principal carboidrato armazenado (RODRIGUES, 1995; SINGELS; DONALDSON; SMIT, 2005). De maneira geral, uma planta após ter contato com um patógeno ou sofrer uma injúria tende a aumentar suas taxas de respiração e diminuir as taxas fotossintéticas (DALIO; PASCHOLATI, 2018) e uma vez que, a atividade fotossintética diminui, a síntese de compostos orgânicos também tende a reduzir (ZHANG et al., 2016b). Alguns trabalhos apontam que a inoculação com Lxx afeta negativamente certos parâmetros fotossintéticos, destruindo a estrutura dos cloroplastos, degradando a clorofila e reduzindo as taxas fotossintéticas o que consequentemente diminui a quantidade de produtos assimilados (ZHANG et al., 2016a, 2016b; ZHU et al., 2019). Desta forma, o acúmulo de sacarose tende a ser comprometido o que resultaria em menores concentrações de açúcar em plantas infectadas com altas concentrações de Lxx. No entanto, os dados apresentados na Tabela 12 mostram que a maior concentração de Lxx esteve associada a maior porcentagem de brix%caldo e pol%caldo.

Um caldo de cana-de-açúcar com alta pureza indica que a qualidade da matéria-prima é adequada para recuperação do açúcar (RIPOLI; RIPOLI, 2004). As amostras com baixo título bacteriano apresentaram uma pureza estatisticamente ($p < 0,05$) maior em relação as amostras com alto título de Lxx, entretanto em ambos os tratamentos o valor ficou abaixo do indicado na literatura ($> 85\%$). De maneira geral, a redução na pureza do caldo de cana-de-açúcar está relacionada com a infecção por outras doenças que acometem a cultura como: vírus do mosaico (IQBAL et al., 2015; RASSABY et al., 2003; VISWANATHAN et al., 2014; VISWANATHAN;

BALAMURALIKRISHNAN, 2005) e cigarrinha das raízes (RAVANALI et al., 2011). Para o RSD, Roussel e Corcodel (2010) observaram um aumento significativo ($p < 0,05$) na pureza do caldo de cana-de-açúcar conforme houve uma aumento de colonização dos feixes vasculares pela Lxx.

A fibra faz parte dos parâmetros mensurados para se avaliar a qualidade da matéria-prima e está diretamente relacionada a eficiência de extração do caldo. O ARC é um indicador da porcentagem de açúcares redutores na cana-de-açúcar e juntamente com a fibra e os demais parâmetros de qualidade compõe o cálculo de ATR (AMORIM et al., 2004). Os valores obtidos para ARC, fibra/%cana e ATR estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Valores de ARC (%), fibra/%cana e ATR (Kg/ton), determinados segundo o Manual Consecana, para caldo de cana-soca, com alto e baixo título de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, da variedade CB49-260

Variedade	Tratamento	ARC (%)	Fibra/%cana	ATR (Kg/ton)
CB49-260	Alto Título	1,19 ^a ± 0,01	12,34 ^a ± 0,09	112,49 ^a ± 0,50
CB49-260	Baixo Título	1,02 ^b ± 0,03	9,37 ^b ± 0,54	109,09 ^b ± 0,37

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

A porcentagem de ARC (Tabela 13), foi estatisticamente ($p < 0,05$) maior nas amostras com alto título bacteriano em comparação com as amostras de baixo título. Valores maiores para açúcares redutores interferem na recuperação da sacarose e acabam por reduzir a pureza do caldo (JAMBASSI, 2017; PAVÃO, 2012). Desta forma, a maior porcentagem de ARC nas amostras com alto título de Lxx pode ter influenciado na menor pureza das mesmas amostras (Tabela 12).

Outras doenças características da cultura de cana-de-açúcar promoveram um aumento nas concentrações de açúcares redutores como o vírus do mosaico (VISWANATHAN; BALAMURALIKRISHNAN, 2005). No entanto, para o RSD Roussel e Corcodel (2010) observaram reduções significativas ($p < 0,05$) de açúcares redutores associados com o aumento da porcentagem de feixes vasculares colonizados por Lxx, em variedade suscetível ao RSD.

Zhu e colaboradores (2018) observaram que plantas infectadas com Lxx apresentaram uma redução na circulação de água nos colmos. Essa redução provavelmente ocorreu devido o bloqueio nos feixes vasculares pela deposição de gomas e formação de tiloses, o que promove uma redução simultânea na capacidade de transporte de água (CARNEIRO-JUNIOR, 2006; MATSUOKA, 1984; TEAKLE; APPLETON; STEINDL, 1978). Diante desses resultados, a hipótese proposta para esse capítulo é que as maiores concentrações de açúcar (brix%caldo, pol%caldo e ARC) nas amostras com alto título de Lxx, podem não estar associadas a um aumento na produção de açúcar pela planta, mas sim, a uma concentração dos açúcares contidos nos colmos devido a obstrução dos vasos condutores.

A fibra%cana (Tabela 13) foi estatisticamente ($p<0,05$) maior nas amostras de caldo com alto título de Lxx. O aumento na porcentagem de fibra já foi relatado para vírus da folha amarela (RASSABY et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2007), no entanto para o RSD ainda não houverem relatos do impacto da doença em percentuais de fibra da cana-de-açúcar. O valor de ATR (Tabela 13) foi consequentemente maior nas amostras com alto título de Lxx, uma vez que o ATR é calculado a partir do ARC e da pol. Além disso, houve diferença estatística ($p<0,05$) entre os tratamentos, mostrando que neste caso, a quantidade de título de Lxx pode influenciar no valor de ATR. Grisham e colaboradores (2009) avaliaram as concentrações de ATR em nove variedades de cana-de-açúcar de primeira soca, e observaram que em seis delas o ART foi superior nos colmos com maior título de Lxx, sendo que, apenas uma variedade apresentou diferença estatística entre seus tratamentos.

4.3.3. Análises físico-químicas do caldo de cana-de-açúcar

A produção de ácidos orgânicos, que tendem a diminuir o pH e aumentar a acidez, e de compostos fenólicos por parte das plantas, como uma resposta contra ataques, pode vir a prejudicar o processamento da cana-de-açúcar e acabar diminuindo o rendimento e a qualidade dos produtos finais (BI et al., 1997; GUIMARÃES et al., 2008; RAVANELI et al., 2011; TAIZ; ZEIGER, 2004). A cor ICUMSA é um importante fator atribuído a qualidade de caldo e do açúcar. Caldos mais escuros tendem a influenciar nas características finais do açúcar produzido e açúcares com maiores índices de cor tem grande impacto na indústria quando destinados a produção de produtos que incolores como, por exemplo, refrigerantes e balas. A turbidez é um fator que indica a quantidade de partículas dispersas em uma solução e no caso do caldo de cana-de-açúcar, pode influenciar diretamente na cor ICUMSA (ALBUQUERQUE, 2011). Os valores obtidos para pH, turbidez e cor ICUMSA estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de pH, turbidez (NTU) e cor ICUMSA (U.I.) para caldo de cana-soca, com alto e baixo título de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, da variedade CB49-260

Variedade	Tratamento	pH	Turbidez (NTU)	Cor ICUMSA (U.I.)
CB49-260	Alto Título	5,25 ^b ± 0	1113 ^a ± 1,00	10623,85 ^a ± 144,00
CB49-260	Baixo Título	5,38 ^a ± 0,01	816 ^b ± 2,65	10386,26 ^a ± 288,01

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p<0,05$).

Amostras de caldo de cana-soca com altos títulos de Lxx apresentaram valores significativamente ($p < 0,05$) menores para pH, e significativamente maiores ($p < 0,05$) para turbidez (Tabela 14) em comparação com as amostras de baixo título. Já a cor ICUMSA (Tabela 15) foi maior em caldo com alto título Lxx, porém, sem apresentar diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Ainda são pouco os estudos relacionando o RSD com parâmetros físico-químicos como pH, turbidez e cor ICUMSA. Roussel e Corcodel (2010) não observaram diferenças estatísticas nos valores de pH de caldo de cana-de-açúcar suscetível ao RSD. Além do RSD, reduções de pH também foram relacionados ao aumento populacional de cigarrinha das raízes (RAVANELI et al., 2011).

Muitos trabalhos da literatura citam que o escurecimento do caldo de cana-de-açúcar está relacionado com reações enzimáticas de compostos fenólicos (NGUYEN; DOHERTY, 2011; OGANDO et al., 2019; PATON, 1992a, 1992b; PATON; DUONG, 1992a, 1992b; PATON; DUONG; BARTLETT, 1992; SMITH et al., 1981; SMITH; PATON, 1985). Os compostos fenólicos fazem parte da estrutura da cana-de-açúcar, possuem importantes papéis nos mecanismos de defesa da planta (PASCHOLATI; DALIO, 2018; RUTHERFORD, 2013) e em geral passam a integrar o caldo após a etapa de extração, podendo interferir na produção de açúcar (BUCHELI; ROBINSON, 1994). As concentrações de fenólicos totais e flavonóides totais estão descritas na Tabela 15.

Tabela 15. Valores de fenólicos totais (g L^{-1}) e flavonóides totais (g L^{-1}) para caldo de cana-soca, com alto e baixo título de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, da variedade CB49-260

Variedade	Tratamento	Fenólicos totais (g L^{-1})	Flavonóides totais (g L^{-1})
CB49-260	Alto Título	$0,599^a \pm 0,01$	$0,917^a \pm 0,19$
CB49-260	Baixo Título	$0,258^b \pm 0,01$	$0,883^a \pm 0,13$

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

As concentrações de fenólicos e flavonóides totais (Tabela 15) foram maiores nos caldos com alto título de Lxx, contudo, apenas a concentração de fenólicos totais apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos. De uma maneira geral a resistência de plantas a qualquer tipo de ataque envolve uma série de fatores e compostos, os quais podem já estarem presentes de maneira constitutiva ou podem vir a serem produzidos após uma indução (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Os compostos fenólicos são um exemplo de compostos pré-formados que exercem importantes papéis na defesa das plantas sendo compostos precursores de componentes antimicrobianos (HAHLBROCK; SCHEEL, 1989; SANTIAGO et al., 2009). Os compostos fenólicos e flavonóides além de exercerem o papel de defesa nas plantas em geral, acabam sendo

responsáveis pelo escurecimento do caldo e por influenciarem um aumento de cor no açúcar produzido (GODSHALL, 1999; PATON; DUONG, 1992b; PATON; DUONG; BARTLETT, 1992). A presença de compostos fenólicos no momento da cristalização, pode interferir no processo, aumentar a intensidade da cor e influenciar negativamente na qualidade final do produto (MADALENO, 2010).

Para o RSD, Roussel e Corcodel (2010) não observaram diferenças estatísticas nas concentrações de fenólicos em amostras inoculadas com Lxx. Já para outras doenças que acometem a cultura da cana-de-açúcar, Madaleno et al. (2008) e Santiago et al. (SANTIAGO et al., 2009) relataram um aumento de compostos fenólicos em decorrência do aumento de infestação e sintomas relacionados a cigarrinha das raízes e a escaldadura das folhas, respectivamente.

Como já discutido no capítulo anterior, a técnica comumente utilizada para quantificar fenólicos totais em alimentos envolve o uso do reagente Folin-Ciocalteu, o qual possui em sua composição os ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico. Em meio alcalino, substâncias redutoras da amostra tendem a promover a redução desses ácidos formando os óxidos molibdênio e tungstênio que possuem coloração azul e são detectáveis à 765 nm (MILENE ANGELO; JORGE, 2006). Em caldo de cana-de-açúcar, além dos compostos fenólicos, os açúcares redutores também são substâncias redutoras que podem promover essa reação em contato com o reagente Folin-Ciocalteu. Desta forma, o maior valor para AR obtido nas mesmas amostras com altos títulos de Lxx (Tabela 13) pode então ter interferido nos resultados obtidos para a quantificação de fenólicos totais.

4.3.4. Quantificação de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência

Algumas substâncias solúveis no caldo, como por exemplo o amido, podem interferir nas análises tecnológicas como na determinação de pol%caldo e açúcares redutores e acabar por superestimar os resultados (ALVES; DE AGUIAR; SARMENTO, 2013; MANARIM, 2017). Desta forma, para se obter resultados mais exatos em relação ao teor de açúcar contidos no caldo de cana-de-açúcar, foi realizada a quantificação dos açúcares sacarose, glicose e frutose por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), uma vez que essa é uma técnica de maior precisão (MANARIM, 2017). Os valores para sacarose, frutose e glicose, estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16. Valores para sacarose (mg mL⁻¹), frutose (mg mL⁻¹) e glicose (mg mL⁻¹) para caldo de cana-soca, com alto e baixo título de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, da variedade CB49-260

Variedade	Tratamento	Sacarose (mg mL ⁻¹)	Frutose (mg mL ⁻¹)	Glicose (mg mL ⁻¹)
CB49-260	Alto Título	204,50 ^a ± 1,15	30,40 ^a ± 0,22	22,27 ^a ± 0,34
CB49-260	Baixo Título	185,62 ^b ± 1,20	11,77 ^b ± 0,24	8,37 ^b ± 0,24

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Corroborando com os dados apresentados anteriormente para os valores de brix%caldo, pol%caldo (Tabela 12) e ARC (Tabelas 13), as amostras com alto título de Lxx apresentaram as concentrações estatisticamente ($p < 0,05$) maiores para sacarose e dos açúcares redutores (frutose e glicose) (Tabela 16).

Como já discutido anteriormente, a obstrução dos vasos condutores do xilema pode acabar restringindo a passagem da água, o que favorece uma concentração dos sólidos dispersos no caldo (CARNEIRO-JUNIOR, 2006; MATSUOKA, 1984; TEAKLE; APPLETON; STEINDL, 1978). Além disso, alguns autores afirmam que o RSD não afeta diretamente na síntese de açúcar, mas sim na quantidade total de açúcar devido a diferença de peso dos colmos (GRISHAM; JOHNSON; VIATOR, 2009; KAZEEM; IKOTUN, 2019; ZVOUTETE, 2004). Desta forma e diante dos dados apresentados anteriormente, proponha-se que a doença não tenha promovido um aumento na produção do açúcar, mas sim uma concentração desses sólidos no colmo, devido a redução do fluxo de água. Tal hipótese, entretanto não foi avaliada neste trabalho.

Em relação as concentrações de açúcares redutos quantificados por HPLC, é possível observar que a concentração de glicose foi menor entre os açúcares avaliados. Como abordado anteriormente, a glicose já foi apontada como uma das principais fontes de carbonos para o crescimento da Lxx. Rosa (2006) observou que a glicose foi a responsável pelo maior e mais rápido crescimento da Lxx, dentre todos os açúcares testados. A glicose é comumente utilizado como fonte de carbono em meio de cultura MscNew (MONTEIRO-VITTORELLO et al., 2004) que é específico para o crescimento da Lxx. Além disso, a glicose é descrita na literatura como a principal fonte de carbono e energia utilizada por bactérias, arqueobactérias e eucariotos (ROMANO; CONWAY, 1996).

4.4. Conclusão

A maior concentração de Lxx nas amostras de caldo de cana-soca promoveu uma redução na qualidade do caldo de cana-de-açúcar, uma vez que amostras com altos títulos de Lxx apresentaram maiores valores para açúcares redutores%cana, fibra%cana, turbidez, fenólicos totais,

glicose e frutose, fatores que indicam baixa qualidade da matéria-prima. A maior concentração de açúcares redutores nas amostras com alto título de Lxx contribuiu para a redução da pureza do caldo, o que pode consequentemente vir a interferir no processo de recuperação do açúcar, além de poder ter interferido na quantificação de fenólicos totais. A quantificação dos açúcares por cromatografia líquida corroborou com os dados obtidos através das análises tecnológicas e mostrou ainda que a glicose foi o açúcar com menor concentração, nas amostras com alto título de Lxx, o que pode ter ocorrido devido o consumo deste açúcar por parte da bactéria para o seu crescimento.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F. M. DE. **Processo de fabricação do açúcar**. Recife: Editora Universitária UFPE, p. 449, 2011.
- ALVES, F. V.; DE AGUIAR, C. L.; SARMENTO, S. B. S. The effects of starch and dextran on technological analyses of sugarcane juice. **Sugar Journal**, v. 76, n. 3, p. 14–18, 2013.
- AMORIM, H. V. et al. Qualidade da cana-de-açúcar e seu impacto na indústria. In: RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C. (Eds.). **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. 1. ed. Piracicaba: Barros e Marques
- BI, J. L. et al. Do plant phenolics confer resistance to specialist and generalist insect herbivores? **J. Agric. Food Chem**, v. 45, p. 4500–4504, 1997.
- BOLONHEZI, D.; PEREIRA, J. C. V. N. A. Plantio direto na Alta Mogiana. In: **O Agrônomo**. Vol 51. Campinas: [s.n.]. p. 12–15.
- BOVI, R.; SERRA, G. E. Impurezas fibrosas da cana-de-açúcar e parâmetros tecnológicos do caldo extraído. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 885–896, 1999.
- BUCHELI, C. S.; ROBINSON, S. P. Contribution of enzymic browning to color in sugarcane juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 257–261, 1994.
- CARVALHO, G. DE. **Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras**. 2012. 144 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2012.
- CIA, M. C. **Análise transcritômica de plantas de cana de açúcar inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo das soqueiras**. 2014. 105 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2014.
- CONSECANA. **Manual de instruções CONSECANA-SP**. 6. ed. Piracicaba: CONSECANA-SP, 2015.
- COPERSUCAR. Métodos Analíticos. In: COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA. (Ed.). **Manual de controle químico da fabricação de açúcar**. Piracicaba: [s.n.]. 2001. 57 p.
- DALIO, R. J. D.; PASCHOLATI, S. F. Alterações fisiológicas em plantas doentes. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Volume 1 - Princípios e Conceitos**. 5 edição ed. Ouro Fino - MG: Agronômica Ceres, 2018. p. 453–471.

- DE AQUINO, G. S. et al. Sistema radicular e produtividade de soqueiras de cana-de-açúcar sob diferentes quantidades de palhada. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 50, n. 12, p. 1150–1159, 2015.
- GRISHAM, M. P.; JOHNSON, R. M.; VIATOR, R. V. Effect of ratoon stunting disease on yield of recently released sugarcane cultivars in Louisiana. **Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists**, v. 29, n. 29, p. 119–127, 2009.
- GUIMARÃES, E. R. et al. Níveis constitutivos de compostos fenólicos podem estar relacionados a resistência da cana-de-açúcar a cigarrinha-das-raízes. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 1, n. 3, p. 357–365, 2008.
- HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 347–369, 1989.
- ICUMSA. Method G.S. 2/3-9. The determination of sugar solution colour at 7.0 – Accepted. In: **International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis**. 2011.
- IQBAL, A. et al. Detection of mixed infection of phytoplasmas and yellow leaf virus in commercial sugarcane cultivars and their impact on yield and quality parameters. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 5, n. 1, p. 95-96, 2015.
- JAMBASSI, J. R. **Aspectos da qualidade do açúcar: Impactos de diferentes condições de armazenamento e método de classificação por espectroscopia Raman**. 2017. 147 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2017.
- JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: Methods for the analysis of certain phenolics. **J. Agric. Food Chem.**, v. 33, n. 2, p. 213–217, 1985.
- KAZEEM, S. A.; IKOTUN, B. Effect of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* on growth and yield of sugarcane in Nigeria. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, n. 3, p. 587–595, 2019.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. Reagents and procedures for the ultraviolet spectral analysis of flavonoids. In: **The Systematic Identification of Flavonoids**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1970. p. 35–40.
- MADALENO, L. L. et al. Influence of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) injury on the quality of cane juice. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 68–73, 2008.
- MANARIM, G. R. **Interferentes analíticos provenientes da colheita, carregamento e transporte nas análises tecnológicas do caldo de cana-de-açúcar**. 2017. 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2017.

- MARCHIORI, L. F. S. **Influência da época de plantio e corte na produtividade da cana-de-açúcar**. 2004. 273 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
- MATSUOKA, S. Longevidade do efeito do tratamento térmico em canas infectadas pelo raquitismo da soqueira. **Summa Phytopathologica**, v.2, p.57-59, 1984.
- MATTOS, E. et al. Molecular detection of *Trypanosoma cruzi* in acai pulp and sugarcane juice. **Acta Tropica**, v. 176, p. 311–315, 2017.
- MOORE, P. H.; PATERSON, A. H.; TEW, T. Sugarcane: The crop, the plant, and domestication. In: MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. (Eds.). **Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2014. p. 1–17.
- NGUYEN, D.; DOHERTY, W. Phenolics in sugar cane juice: Potential degradation by hydrogen peroxide and fenton's reagent. **Proc Aust Soc Sugar Cane Technol**, v. 33, p. 1–10, 2011.
- OGANDO, F. I. B. et al. Removal of phenolic, turbidity and color in sugarcane juice by electrocoagulation as a sulfur-free process. **Food Research International**, v. 122, p. 643–652, jan. 2019.
- PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do Parasitismo: Como as Plantas se Defendem dos Patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). . **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. p. 423–452.
- PATON, N. H. The origin of colour in raw sugar. **Proc. Australian Soc. Sugarcane Technol.**, v. 14, p. 8–17, 1992a.
- PATON, N. H. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part I. Determination of chlorogenic acid and other phenolics in sugar cane by HPLC. **International Sugar Journal**, v. 94, p. 99–108, 1992b.
- PATON, N. H.; DUONG, M. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part II. Concentration of phenolics in sugar cane and colour of first expressed juice. **International Sugar Journal**, v. 1124, p. 170–176, 1992a.
- PATON, N. H.; DUONG, M. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part III. Role of chlorogenic acid and flavonoids in enzymic browning of cane juice. **International Sugar Journal**, v. 94, n. 1124, p. 170–176, 19 jul. 1992b.
- PATON, N. H.; DUONG, M.; BARTLETT, M. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part IV. Statistical relationships between concentration of chlorogenic acid and flavonoids in cane, colour of cane extracts and colour of first expressed juice. **International Sugar Journal**, v. 94, n. 1125, p. 205–210, 1992.

- PAVÃO, M. A. **Influência da cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*) e da adubação na qualidade do caldo e da cana-de-açúcar**. 2012. 66 f. dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) - Universidade Federal de São Carlos, 2012.
- PORTO, A. C. F.; DE ALMEIDA, R. R.; CALSA JUNIOR, T. Raquitismo da soqueira: A realidade da ação de um discreto agente nocivo em canaviais brasileiros. In: GAMA, M. A. S. et al. (Eds.). **Estado da arte em fitobacterioses tropicais**. Recife: Editora Universitária da UFRPE, 2016. p. 275–290.
- POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. **Trends in Genetics**, v. 11, n. 6, p. 217–218, 1995.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing, 2019.
- RASSABY, L. et al. Impact of Sugarcane yellow leaf virus on sugarcane yield and juice quality in Réunion Island. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, n. 5, p. 459–466, 2003.
- RAVANELI, G. C. et al. Spittlebug impacts on sugarcane quality and ethanol production. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46, n. 2, p. 120–129, 2011.
- RICAUD, C. et al. **Diseases of sugarcane - Major diseases**. Amsterdam: ELSEVIER SCIENCE BV, 1989.
- RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Piracicaba: Barros e Marques Editoração Eletrônica. 1 ed. 2004. p. 185-193.
- RODRIGUES, J. D. **Fisiologia da cana-de-açúcar. Apostila**. Botucatu —SP. Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Instituto de Biociências, 1995. Disponível em: <papers://d28dd570-4187-41d3-8cf5-6edf67fea1b9/Paper/p2843>
- ROSA, D. D. **Uma abordagem genômica para o entendimento do crescimento fastidioso de *Leifsonia xyli* subsp . *xyli***. 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
- ROUSSEL, C.; CORCODEL, L. Evaluation of a reunionese variety infected by ratoon stunting disease. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol**, v. 27, p. 1-6, 2010.
- RUTHERFORD, R. S. Mechanisms of resistance to pests and pathogens in sugarcane and related crop species. In: MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. (Eds.). **Sugarcane: physiology, biochemistry, and functional biology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2013. p. 435–482.
- SANTIAGO, R. et al. Changes in phenolic acids content, phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in sugarcane leaves induced by elicitors isolated from *Xanthomonas albilineans*. **Australasian Plant Pathology**, v. 38, n. 4, p. 357–365, 2009.

- SHIMADZU APPLICATION NEWS. No. L294 - **Application of Evaporative Light Scattering Detector ELSD-LT (Part 2) Analysis of Oligosaccharides in Beer**. Disponível em: <<http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/lc/l294.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2017.
- SILVA, T. G. E. R. DA. **Raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar: transmissão do patógeno via sementes e avaliação quantitativa de seu controle através da termoterapia de toletes**. 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2013.
- SIMITH, P.; PATON, N. H.; DELANEY, H. R.; AMES, R. Colour Studies in milling. **Proceedings of Australian Society of Sugar Cane Technologists**, 1981.
- SINGELS, A.; DONALDSON, R. A.; SMIT, M. A. Improving biomass production and partitioning in sugarcane: theory and practice. **Field Crops Research**, v. 92, p. 291–303, 2005.
- SMITH, P.; PATON, N. H. Sugarcane flavonoids. **Sugar Technology Reviews**, v. 12, p. 117–142, 1985.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TEAKLE, D. S. S.; APPLETON, J. M.; STEINDL, D. R. L. R. L. An anatomical basis for resistance of sugar cane to ratoon stunting disease. **Physiological Plant Pathology**, v. 12, n. 1, p. 83–91, jan. 1978.
- URASHIMA, A. S.; ZAVAGLIA, A. C. Comparação de dois métodos diagnósticos de escaldadura-das-folhas (*Xanthomonas albilineans*) da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathol.**, v. 38, n. 2, p. 155–158, 2012.
- VASCONCELOS, A. C. M. et al. Effects of *sugarcane yellow leaf virus* infection on sugarcane yield and root system development. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.**, v. 26, p. 1051–1056, 2007.
- VISWANATHAN, R. et al. Impact of *sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) infection on physiological efficiency and growth parameters of sugarcane under tropical climatic conditions in India. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 7, p. 1805–1822, 2014.
- VISWANATHAN, R.; BALAMURALIKRISHNAN, M. Impact of mosaic infection on growth and yield of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 7, p. 61–65, 2005.
- VITTI, A. C. et al. Sugar cane yield related to the residual nitrogen from fertilization and the root system. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 249–256, 2007.
- YOUNG, A. J. The Invisible Disease. **Plant Disease**, v. 102, n. March, p. 473–482, 2018.

- ZEKARIAS, Y. et al. Effect of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* concentration on yields of four sugarcane varieties in the sugarcane plantations of Ethiopia. **Ethiopian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 25–30, 2012.
- ZHANG, X. et al. Morphological and physiological responses of sugarcane to *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* infection. **Plant Disease**, v. 100, n. 12, p. 2499–2506, dez. 2016a.
- ZHANG, X. Q. et al. Influence of inoculation of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* on photosynthetic parameters and activities of defense enzymes in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 19, n. 4, p. 1–8, 2016b.
- ZHU, K. et al. The physiological characteristics and associated gene expression of sugar cane inoculated with *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 1, p. 44–52, 2018.
- ZHU, K. et al. Functional analysis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* membrane protein gene Lxx18460 (anti-sigma K) . **BMC Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 1–12, 2019.
- ZVOUTETE, P. Ratoon stunting disease reduces cane and sugar yields of five commercial varieties grown in the south-east lowveld of Zimbabwe. **Proc S Afr Sug Technol Ass**, v. 78, p. 181–188, 2004.

5. AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS EM VARIEDADE SUSCETVEL DE CANA-PLANTA CULTIVADA EM CAMPO

RESUMO

O raquitismo das soqueiras é causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) e é considerado uma das mais importantes pragas da cultura da cana-de-açúcar. Muitas pesquisas indicam que a doença favorece a redução de produção, contudo, poucos trabalhos avaliam a qualidade da matéria-prima destinada ao processamento industrial. Desta forma, um experimento em campo foi conduzido a partir de mudas já infectadas, utilizando a variedade CB49-260 que é suscetível a doença. Os caldos obtidos após um ano de cultivo (cana-planta) foram avaliados através de análises tecnológicos, físico-químicas e atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase. Além disso, também foi avaliado o teor de lignina do bagaço da cana-de-açúcar. A doença não aparentou impactar negativamente a qualidade da matéria-prima, uma vez que amostras com os maiores títulos de Lxx apresentaram valores estatisticamente maiores para pol%caldo, pureza e açúcares totais recuperáveis e valores estatisticamente menores para açúcares redutores%cana, cor ICUMSA, turbidez, fenólicos e flavonóides totais. Os teores de brix%caldo e fibra%cana não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos. Amostras com menores títulos de Lxx apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos totais e flavonóides totais, os quais podem ter influenciado nas menores porcentagens de pol%caldo e nos maiores índices de cor ICUMSA e turbidez nas mesmas amostras. Para a avaliação da atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase e do teor de lignina total do bagaço não houve diferença estatística entre os tratamentos, mostrando que a quantidade de Lxx nas amostras não foi suficiente para influenciar esses parâmetros.

Palavras-chave: Cor ICUMSA; Lignina; Polifenoloxidase; Peroxidase.

ABSTRACT

Ratoon stunting disease is caused by the bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) and is considered one of the most important pests in sugarcane culture. A lot of research indicates that the disease favors the reduction of production, however, few studies evaluate the technological quality of the raw material destined for industrial processing. Thus, a field experiment was conducted from seedlings already infected, using the variety CB49-260 which is susceptible to disease. The juices obtained after one year of cultivation (plant cane) were evaluated through technological, physical-chemical analysis and enzymatic activity of peroxidase and polyphenol oxidase. In addition, the lignin content of sugarcane bagasse was also evaluated. The disease did not appear to negatively impact the quality of the raw material, since samples with the highest Lxx titers showed statistically higher values for pol%juice, purity and total recoverable sugars and statistically lower values for reducing sugars%sugarcane, color ICUMSA, turbidity, phenolics and total flavonoids. The levels of brix%juice and fiber%cane did not show statistical differences between treatments. Samples with lower Lxx titers showed the highest concentrations of total phenolic compounds and

total flavonoids, which may have influenced the lowest percentages of pol%juice and the highest ICUMSA color and turbidity indices in the same samples. For the evaluation of the activity of the peroxidase and polyphenol oxidase enzymes and the total lignin content of the bagasse, there was no statistical difference between the treatments, showing that the amount of Lxx in the samples was not sufficient to influence these parameters.

Keywords: ICUMSA Color; Lignin; Polyphenol Oxidase; Peroxidase.

5.1. Introdução

A cana-de-açúcar é a matéria-prima utilizada para a produção de inúmeros produtos como o açúcar, o etanol, a cachaça, a garapa e outros (BRAZ, 2003). Diversos fatores podem afetar a produtividade de um canavial, como deficiência hídrica e nutricional, plantio errôneo, cultivo de variedades já ultrapassadas, pouca renovação dos canaviais e a ocorrência de plantas daninhas, pragas e doenças (CARNEIRO-JUNIOR, 2006).

O raquitismo das soqueiras (do inglês: *Ratoon stunting disease* - RSD) é uma doença causada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) que acomete a cultura da cana-de-açúcar. A bactéria é transmitida através do uso de mudas contaminadas, ou então, pelo uso de instrumentos de corte e plantio já contaminados (COMSTOCK, 2002), não sendo relatado na até o momento a existência de um vetor para doença (KAZEEM; IKOTUN, 2019). A doença já foi relatada em quase todos os lugares de cultivo da cultura e em uma única safra, a diminuição da biomassa pode chegar a 27%. No geral, plantas contaminadas tendem a ter um crescimento lento e irregular quando comparadas com plantas saudáveis, contudo, o crescimento geral da safra, em muitos casos, não chega a ser insatisfatório (JAMES, 1996; TOKESHI; RAGO, 2016). Os danos causados pela doença tendem a se tornar mais severos com a alta presença do patógeno, devido aos sucessivos cortes, condições de seca e presença de outras doenças (CARNEIRO-JUNIOR, 2006; TOKESHI; RAGO, 2016).

A qualidade da cana-de-açúcar impacta diretamente no desempenho dos processos industriais, os quais são essenciais para obtenção de rendimentos satisfatórios e um produto final de qualidade (RAVANELI, 2010). Devido ao ataque de patógenos, as perdas de açúcares na cana-de-açúcar podem ocorrer de forma direta, através da redução de peso dos colmos, aumento do teor de fibra e conseqüentemente redução da quantidade de caldo extraído, ou então de forma indireta, devido ao uso da reserva de açúcares para a produção de biomoléculas como polissacarídeos, compostos fenólicos e lignina (LEAL et al., 2008; MUTTON, 2003, 2008).

A parede celular da planta é uma estrutura altamente complexa composta basicamente de celulose, hemicelulose e lignina (SANT'ANNA et al., 2013). A lignina compreende de 20 a 30% de todo o material que constitui a parede celular vegetal, sendo um dos componentes mais importantes (OGATA, 2013; PASCHOLATI; DALIO, 2018). O processo de lignificação torna as paredes celulares das plantas mais rígidas e resistente, impedindo a entrada de patógenos e a ação das suas toxinas (RUTHERFORD, 2013). Alguns compostos fenólicos de baixa massa molecular e que participam da rota da síntese de lignina podem ter ação tóxica para o patógeno (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Ainda que sejam poucos os estudos, há evidências que a lignina e/ou os compostos que fazem parte da sua rota de produção contribuem para resistência de plantas contra bactérias (NYALUGWE et al., 2016; PASCHOLATI; DALIO, 2018). A enzima fenilalanina amonilase (do inglês: *phenylalanine ammonia lyase* - PAL) é a responsável por iniciar a rota de produção da lignina, através da conversão da L-fenilalanina em ácido cinâmico. Na etapa final da síntese, acontece a oxidação de hidroxilas dos grupos fenólicos pelas ação da enzima peroxidase (do inglês: *peroxidase* - POD) (PASCHOLATI; DALIO, 2018; VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980). Alguns estudos apontam um aumento significativo nos níveis de expressão dos genes da enzima PAL após a infecção por RSD em cana-de-açúcar (CIA et al., 2018; ZHU et al., 2017).

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas e possuem diversas funções. Alguns contribuem para a coloração das plantas, outros atuam na defesa, podendo atuar também como metabólicos intermediários na síntese de outros compostos, como a lignina. Certos compostos passam de formas atóxicas para tóxicas após a planta sofrer algum tipo de estresse bióticos e/ou abiótico (SILVA; REIS, 2008; ZHAO et al., 2008). Alguns estudos relatam o aumento de ácidos fenólicos devido a incidência de pragas e doenças na cana-de-açúcar (FONTANIELLA et al., 2003; RAVANELI et al., 2011).

A cor do caldo de cana-de-açúcar é formada por uma mistura complexa contendo vários pigmentos que são formados por diferentes reações. Existem três mecanismos não-enzimáticos que favorecem o aumento de cor no caldo: (1) a reação de Maillard, que ocorre entre açúcares e aminoácidos, formando pigmentos conhecidos como melanoidinas; (2) reações de condensação e degradação térmica do açúcar, promovendo a caramelização; e (3) a degradação alcalina e térmica dos açúcares redutores (glicose e frutose), o qual promovem a formação de compostos escuros e ácidos, que favorecem a inversão da sacarose e formação de cor (OGANDO, 2019; SARTORI, 2017; WOO et al., 2015). Há ainda reações enzimáticas que promovem a formação de quinonas através da oxidação dos compostos fenólicos pela ação das enzimas polifenoloxidase (do inglês: *polyphenol oxidase* - PPO) e a peroxidase (POD). Essa oxidação ocorre principalmente durante as etapas de preparo da cana-de-açúcar e extração do caldo, devido a ruptura do material vegetal

(BUCHELI; ROBINSON, 1994; RUTHERFORD, 2013; VÁMOS-VIGYÁZÓ; HAARD, 1981; WHITEHEAD; DE SWARDT, 1982). A presença desses componentes coloridos no caldo acaba dificultando a cristalização e reduzindo o rendimento de açúcar, além disso, alguns ácidos fenólicos permanecem no produto final, como é o caso dos ácidos ferúlico, *p*-cumárico e caféico. A presença desses ácidos pode contribuir para um aumento de cor do açúcar durante o armazenamento, o que prejudica a sua qualidade e impacta negativamente no valor de comercialização (CALDAS, 2012; OGANDO, 2019; PAYET; SING; SMADJA, 2006; RUTHERFORD, 2013; ZHAO et al., 2011).

Apesar de muitos estudos relacionando a interferência de pragas e doenças na produtividade da matéria-prima, poucos são os estudos focados no processamento da cana-de-açúcar para a produção de açúcar. Desta forma, para melhor estimar os danos provocados pela presença da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* no caldo de cana-de-açúcar, foram avaliadas plantas de primeiro corte da variedade CB49-260, suscetível a doença. As mudas contaminadas foram cultivadas em campo e os caldos obtidos foram avaliados através das análises tecnológicas, físico-químicas e atividade das enzimas oxidases. Além disso, foi avaliado o teor de lignina total do bagaço.

5.2. Material e métodos

5.2.1. Plantio das gemas e condução do experimento

As gemas utilizadas neste experimento foram coletadas em fevereiro/2018 de uma matriz cultivada no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) (Figura 13).

As gemas foram cortadas com tesoura de poda, higienizadas com água e plantadas em bandejas para mudas de 0,5 mL contendo substrato Basaplanta (Base). As bandejas permaneceram em casa de vegetação com condições controladas de temperatura média de 25,5 °C, umidade relativa do ar de 58% e irrigações diárias (Figura 14).

Figura 13. Matriz da variedade CB49-260 cultivada no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ).

Figura 14. Gemas da variedade CB49-260 provenientes da matriz e cultivadas em casa de vegetação.

Em março/2018, por volta de 30 dias após a instalação em casa de vegetação, as mudas foram transplantadas para o campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ). Foram transplantadas 54 mudas assintomáticas e 54 mudas sintomáticas dispostas em um delineamento inteiramente casualizados (DIC). A profundidade dos sulcos foi de 20 a 30 cm e o espaçamento entre cada muda de 0,7 m. Cada bloco era composto 3 repetições (linhas) de plantas sintomáticas (#CBI) e 3 repetições (linhas) de plantas assintomáticas (#CBNI). Cada linha possuía 3 m de comprimento e eram separadas por uma distância de 1,2 m. A distância entre os blocos foi de aproximadamente 1,5 m (Figura 15). A adubação foi feita com aproximadamente 9,05 g de

adubo NPK 10-10-10 (Drago) por planta, 15 dias após o plantio e em seguida mensalmente. O regime de irrigação era feito manualmente, caso não houvesse precipitações (Figura 16).

Figura 15. Croqui do experimento conduzido em campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ).

Figura 16. Plantas da variedade CB49-260 cultivadas em campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ). Estacas brancas representam a fileira com canas assintomáticas (#CBNI) e as estacas pretas representam as fileiras de canas sintomáticas (#CBI).

A colheita da cana-planta foi realizada um ano após o plantio em março de 2019. Os colmos principais, previamente marcados, foram coletados, desfibrados em desfibrador (Arno S.A) (Figura 17 A) e prensados em prensa hidráulica (Figura 17 B) para a obtenção dos caldos. Os caldos obtidos foram filtrados para a eliminação de bagacilhos, armazenados em frascos de polipropileno e acondicionados a $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ até a realização dos ensaios experimentais.

Figura 17. Equipamentos utilizados para a extração do caldo de cana-de-açúcar: (A) Desfibrador Mod. A t 56 a (Arno S.A, Brasil); (B) prensa hidráulica (Codistil, Brasil).

5.2.2. Quantificação e determinação do título bacteriano

5.2.2.1. Extração de DNA em caldo de cana-de-açúcar

Para a extração de DNA em material vegetal (CIA, 2014; POSPIECH; NEUMANN, 1995), foram selecionadas aleatoriamente 5 plantas de cada tratamento (sintomáticas e assintomáticas) entre os blocos. Cerca de 100 mg de tecido foliar, proveniente da bainha da folha +1, foram macerados com nitrogênio líquido em gral (almofariz) de porcelana com o auxílio de pistilo. Em seguida, os materiais macerados foram transferidos para tubos de *Eppendorfs*, de 1,5 mL, recém autoclavados. A coleta de material vegetal foi feita em três tempos distintos: 15, 180 e 365 dias após o plantio. Os materiais vegetais macerados foram lavados duas vezes em solução de NaCl 1 M em tampão T10E10 (Tris 10 mM; EDTA 10 mM, pH 8,0) e centrifugados a 12.000 rpm por 5 min a 4°C , sendo em seguida descartados os sobrenadantes.

Os precipitados foram ressuspensos em 337,5 μL de solução SET (NaCl 75 mM; EDTA 25 mM; Tris-base 20 mM, pH 5,0), com a adição de 1 mg mL^{-1} de lisozima e incubadas a 37°C por 2 h. Após este período de incubação, foram adicionados 35 μL de SDS 10% (p/v) contendo 0,5 mg mL^{-1} de proteinase K e as amostras foram levadas para incubação por 2 h a 55°C . Em seguida, foram adicionados 125 μL de NaCl 5 M e 375 μL de clorofórmio e as amostras ficaram incubadas durante 30 min a temperatura ambiente ($26 \pm 1^\circ\text{C}$). Após esse período, os tubos

foram centrifugados a 5000 rpm por 15 min a 4 °C, seus sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e foram adicionados 375 µL de isopropanol gelado em cada amostra.

As amostras ficaram armazenadas por um período de 12 h a -8 °C e em seguida foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado seco em estufa por 30 min a 37 °C. Após a secagem foram ressuspensos em 200 µL de tampão T₁₀E₁₀ e adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de CTAB 10% (p/v) diluído em NaCl 1 M. As amostras foram aquecidas por 10 min a 65 °C, acrescentados 600 µL de clorofórmio e centrifugadas a 12000 rpm por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado, antes de incubá-los por 2 h a -20 °C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C e os sobrenadantes foram descartados. Foram feitas duas lavagens dos precipitados com etanol 70% (v/v) gelado, centrifugando sempre após cada lavagem por 10 min a 12000 rpm. Os DNAs foram secos por 30 min em estufa a 37 °C e ressuspensos em 40 µL de água ultrapura autoclavada, contendo RNase (10 µg mL⁻¹).

5.2.3. Quantificação e determinação do título bacteriano em material vegetal de cana-de-açúcar

Após a extração, o DNA de cada amostra foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (Thermo Scientific) e a seguir as concentrações foram ajustadas para 50 ng µL⁻¹ (CIA, 2014; POSPIECH; NEUMANN, 1995). Para determinar o título bacteriano nas amostras de caldo de cana-de-açúcar foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) com um termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG segundo as recomendações do fabricante. As reações de qPCR foram feitas como descrito por Cia (2014) e Carvalho (2012). Para as reações de qPCR foram utilizados 2 µL de DNA 50 ng µL⁻¹, 12,5 µL de tampão de amplificação SuperMix, *primer* 12950F 0,2 × 10⁻⁷ mol L⁻¹, *primer* 12950R 0,2 × 10⁻⁷ mol L⁻¹, padrão de referência interna (ROX) 50 nM e água *Nuclease free* para um volume final de 25 µL. Inicialmente foram feitos 2 ciclos de amplificação, um a 50 °C por 2 min e outro a 95 °C por 5 min e em seguida foram feitos 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 s, anelamento e extensão a 60 °C por 30 s. Uma curva padrão, para correlacionar as diferentes massas de DNA com os valores de Ct (*cycle threshold*), foi feita utilizando os valores conforme a Tabela 17.

Tabela 17. Correlação entre quantidade de DNA por reação e número de células de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

DNA de Lxx por reação	Células de Lxx
10 ng	$3,8 \times 10^6$
1 ng	$3,8 \times 10^5$
0,1 ng	$3,8 \times 10^4$
0,01 ng	$3,8 \times 10^3$
0,001 ng	380
0,0001 ng	38

5.2.4. Análises tecnológicas do caldo de cana-de-açúcar

5.2.4.1. Peso do bolo úmido

O peso do bolo úmido (PBU) foi obtido segundo as normas ABNT NBR 16221 e 16271 (CONSECANA, 2015), onde o seu peso deve ser aferido em balança de precisão com menor divisão de 0,1 g.

5.2.4.2. Sólidos solúveis do caldo

A determinação de sólidos solúveis do caldo de cana-de-açúcar (brix%caldo) foi realizada de acordo com a Norma ABNT NBR 16223 (CONSECANA, 2015), por leitura direta do caldo utilizando um refratômetro de bancada (Bellingham + Stanley Ltd.), previamente calibrado com água destilada.

5.2.4.3. Porcentagem em massa de sacarose aparente

A quantificação da porcentagem em massa de sacarose aparente (pol%caldo), foi feita segundo as normas NBR 16224 e 16271 (CONSECANA, 2015). Foi utilizado um polarímetro modelo ADS 420 saccharimeter, Bellingham + Stanley Ltd. e uma mistura a base de alumínio como o agente clarificante. Primeiramente foi feita a conversão da leitura sacarimétrica com a mistura clarificante à base de alumínio (LAL) para leitura equivalente em subacetato de chumbo (LPd) através da Equação 1 e em seguida foi calculado o valor de pol%caldo de acordo com a Equação 2.

$$LPb = 1,00621 \times LAL + 0,05117 \quad (1)$$

Onde,

LPd: Leitura sacarimétrica obtida a base de subacetato de chumbo

LAL: Leitura sacarimétrica obtida através da mistura clarificante a base de alumínio.

$$Pol\%caldo = LPb \times (0,2605 - 0,0009882 \times Brix) \quad (2)$$

5.2.4.4. Pureza aparente do caldo

A pureza aparente do caldo (Q) foi calculada (Equação 3) segundo a Norma ABNT NBR 16271 (CONSECANA 2015):

$$Q = (Pol\%caldo \div Brix\%caldo) \times 100 \quad (3)$$

5.2.4.5. Açúcares redutores do caldo

Os açúcares redutores do caldo (AR%caldo) foram calculados (Equação 4) segundo a Norma ABNT NBR 16252 (CONSECANA, 2015), onde Q é a pureza do caldo de cana-de-açúcar:

$$AR\%caldo = 3,641 - (0,0343 \times Q) \quad (4)$$

5.2.4.6. Fibra%cana

Os teores de fibra%cana (F) foram calculados (Equação 5) segundo a Norma ABNT NBR 16225 (TANIMOTO) (CONSECANA, 2015), onde PBU é o peso do bolo úmido.

$$F = 0,08 \times PBU + 0,876 \quad (5)$$

5.2.4.7. Pol%cana

A pol%cana (PC) foi determinada de acordo com a Norma ABNT NBR 16271 (CONSECANA, 2015) através da Equação 6, onde F é a fibra%cana e C é o coeficiente utilizado para conversão de pol do caldo em pol de cana calculado de acordo com a Equação 7.

$$Pol\%cana = Pol\%caldo \times (1 - 0,01 \times F) \times C \quad (6)$$

$$C = 1,0313 - 0,00575 \times F \quad (7)$$

5.2.4.8. Açúcares redutores%cana

Os açúcares redutores%cana (ARC) foram determinados de acordo com a Norma ABNT NBR 16271 (CONSECANA, 2015) através da Equação 8, onde F é a fibra%cana e C o coeficiente.

$$ARC = AR\%caldo \times (1 - 0,01 \times F) \times C \quad (8)$$

5.2.4.9. Açúcar total recuperável

O açúcar total recuperável (ATR) (Equação 9) foi determinado de acordo com a Norma ABNT NBR 16271 (CONSECANA, 2015), onde ATR é o teor de açúcar total recuperável, expresso em quilogramas por tonelada de cana (kg/t), $10 \times PC$ é o valor de pol%cana por tonelada de cana; 1,05263 é o coeficiente estequiométrico para a conversão de pol em açúcares redutores; 0,915 é o coeficiente de recuperação, para uma perda industrial de 8,5% e $10 \times ARC$ é o valor de açúcares redutores%cana por tonelada de cana.

$$ATR = 10 \times PC \times 1,05263 \times 0,915 + 10 \times ARC \times 0,915 \quad (9)$$

5.2.5. Análises Físico-Químicas do caldo de cana-de-açúcar

5.2.5.1. Potencial hidrogeniônico - pH

Para a determinação do pH (COPERSUCAR, 2001) do caldo de cana-de-açúcar, foi utilizado um pHmetro de bancada Tecnal (pH meter Tec 2), previamente calibrado com padrões 4,0 e 7,0.

5.2.5.2. Turbidez

A determinação da turbidez (COPERSUCAR, 2001) do caldo de cana-de-açúcar foi realizada através de leitura direta com um turbidímetro de bancada Tecnopon TB 1000 (Piracicaba, Brasil), previamente calibrado com padrões fornecidos pela mesma empresa. Os valores de turbidez são expressos em NTU (Unidade Nefelométrica de Turbidez).

5.2.5.3. Cor ICUMSA

A análise de cor ICUMSA foi realizada segundo o método GS2/3-9 (ICUMSA, 2011). Através da determinação dos sólidos solúveis foi feito o cálculo para a diluição a fim de se obter um brix%/caldo de 1,25. As amostras foram filtradas em filtro a vácuo (com membranas de filtro de nitrato de celulose, 0,45 µm, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha) e em seguida realizada a correção do pH para $7,0 \pm 0,05$, utilizado HCl (0,1 N) e NaOH (0,1 N). Em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro (UV-mini 1210, Shimadzu, Japão) à 420 nm com cubeta de quartzo de 1 cm e a leitura do brix%/caldo. O índice de cor ICUMSA das amostras foi determinado através das Equações 10 e 11, onde: ABS é a absorbância da amostra lida à 420 nm; BrixC é o valor da leitura de sólidos solúveis na amostra diluída com pH já ajustado; e Brix0 é o valor da leitura de sólidos solúveis na amostra original. Os valores foram expressos em unidade ICUMSA (U.I.).

$$Cor\ ICUMSA\ (420\ nm) = \left[\frac{ABS \times 1000}{densidade \times \frac{BrixC}{100}} \right] \quad (10)$$

$$densidade = 1 + \left(\left(Brix0 \times \frac{200 + BrixC}{5400} \right) \times \left(\frac{BrixC}{Brix0} \right) \right) \quad (11)$$

5.2.5.4. Fenólicos totais

Os teores totais de fenólicos (JULKUNEN-TIITTO, 1985) foram determinados utilizando uma alíquota de 1 mL de caldo de cana-de-açúcar misturado com 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (1:10, v/v), preparado no instante da análise. A solução permaneceu por 40 min em repouso e a seguir houve a adição de 2,5 mL de carbonato de sódio 20% (m/v). As soluções foram homogeneizadas e lidas à 725 nm em espectrofotômetro (UV-mini 1210, Shimadzu, Japão)

com cubeta de quartzo de 1 cm. Para a curva de calibração foi utilizada uma solução de ácido tânico em água destilada ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$).

5.2.5.5. Flavonóides totais

Para a determinação de flavonóides totais (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970) foram misturados 0,5 mL de amostra, 4,3 mL de etanol 70% (v/v), 0,1 mL de cloreto de alumínio a 2% (m/v) e 0,1 mL de acetato de sódio 1 M. As soluções foram homogeneizadas e mantidas em repouso à temperatura ambiente ($26 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) por 40 min. Após o tempo de reação foi aferida a absorbância à 415 nm em espectrofotômetro UV Mini-1240 (UV-mini 1210, Shimadzu, Japão). Para a curva de calibração foi utilizada uma solução de rutina em etanol 70%(p/v) ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$).

5.2.6. Atividades enzimáticas em caldo de cana-de-açúcar

5.2.6.1. Atividade de polifenoloxidase em caldo de cana-de-açúcar

Uma solução de 2,9 mL de catecol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0) foi incubada a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min e em seguida foram adicionados 0,1 mL do caldo de cana-de-açúcar. Após 15 s de reação foi acompanhado o aumento da absorbância à 420 nm durante 5 min em espectrofotômetro (UV-mini 1210, Shimadzu, Japão). A amostra controle foi preparada com uma mistura de 2,9 mL de catecol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0) e 0,1 mL de tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0). Uma unidade de atividade foi definida como sendo o aumento de 0,001 de absorbância por minuto por mL de amostra (LIMA; PASTORE; LIMA, 2001; OKTAY et al., 1995).

5.2.6.2. Atividade de peroxidase em caldo de cana-de-açúcar

Uma solução contendo 1,2 mL de tampão fosfato de sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0) e 1,5 mL de solução de guaiacol 1% foi previamente equilibrada a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Em seguida foram adicionados 0,4 mL de H_2O_2 em tampão fosfato de sódio (0,33 mL de H_2O_2 30% em 100 mL de tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0) e 0,1 mL de caldo de cana-de-açúcar. Após 15 s de reação foi acompanhado o aumento da absorbância à 470 nm durante 5 min em espectrofotômetro (UV-mini 1210, Shimadzu, Japão) à $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A amostra controle foi preparada com uma mistura de

1,5 mL de solução de guaiacol 1%, 1,6 mL de tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0) e 0,1 mL de caldo de cana-de-açúcar (HOLSCHUH, 2000; KHAN; ROBINSON, 1994).

5.2.7. Avaliação do teor de lignina total do bagaço de cana-de-açúcar

5.2.7.1. Preparo das amostras e extração

O bagaço residual da extração do caldo (Item 5.2.1) foi seco em estufa (FANEM – modelo 330) a 105°C , por aproximadamente 12 h. Após a secagem, o material foi moído para se obter frações granulométricas menores que 1,0 mm. A seguir, 5 g desse material foram pesados em envelopes de papel de filtro qualitativo e levados para extração com 300 mL de etanol 95% (v/v) em aparelho Soxhlet (Tecnal, Brasil), com o intuito de remover componentes extrativos, durante um período de 6 h ou mais. Após a extração, as amostras foram secas à temperatura ambiente por um período de aproximadamente 12 h, sendo em seguida determinada a umidade por gravimetria utilizando equipamento de secagem (Spencer, Marte) por 1 h (FERRAZ; MENDONÇA; DA SILVA, 2000).

5.2.7.2. Hidrolise ácida e determinação de lignina solúvel e insolúvel

Em tubos de ensaio foram adicionados 300 mg das amostras preparadas no Item 5.2.7.1 e 3 mL de ácido sulfúrico 72% (v/v). Os tubos foram deixados durante 1 h sob constante agitação a 75 rpm a 30°C em câmara incubadora com agitação orbital (Mod. MA420, Marconi), sendo homogeneizados periodicamente. Em seguida o material foi diluído para uma concentração de 3% de ácido (v/v), através da adição de 79 mL de água destilada e autoclavado à 121°C por 1 h. O material resultante da hidrolise foi filtrado a vácuo com cadinho poroso (número 3). A fração líquida obtida da filtração foi utilizada para a determinação da lignina solúvel, através de leitura em espectrofotômetro UV Mini-1240 (UV-mini 1210, Shimadzu, Japão) à 205 nm. Já a fração sólida, retida no cadinho poroso, foi utilizada para a determinação da lignina insolúvel através da secagem do material em estufa à 105°C durante 1 h, repetindo-se até obtenção de massa constante (FERRAZ; MENDONÇA; DA SILVA, 2000).

5.2.8. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância e suas médias comparadas através do Teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o software R (R CORE TEAM, 2019).

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Quantificação do título bacteriano e validação do experimento

A quantificação de título bacteriano foi realizada em três tempos distintos: 15, 180 e 365 dias após o plantio no campo (Figura 18).

Figura 18. Concentração de DNA de Lxx ($\times 10^6$ de células bacterianas/ μL de caldo de cana) na bainha de folha +1 de cana-de-açúcar via qPCR para a variedade CB49-260 em três tempos de coleta: 15, 180 e 365 dias após o plantio em campo. As barras representam o erro padrão da média. Médias dentro de cada tratamento, seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Visivelmente as amostras sintomáticas apresentam sintomas da doença pois possuíam um porte menor do que as amostras assintomáticas. A quantificação de DNA bacteriano permitiu confirmar essa classificação inicial do experimento (plantas sintomáticas e assintomáticas), uma vez que, plantas classificadas como “sintomáticas” continham mais DNA de Lxx do que as plantas denominadas “assintomáticas”. Além disso, a quantificação permitiu avaliar que houve crescimento bacteriano ao longo dos meses de condução do experimento.

Uma vez que o experimento foi validado, as amostras “sintomáticas” passaram a ser chamadas de “alto título” e as amostras “assintomáticas” passaram a ser descritas como “baixo título”.

Considerando que não houve inoculação direta e que todo DNA de Lxx contido nas plantas era proveniente das gemas já infectadas obtidas das matrizes, a concentração de Lxx é relativamente baixa, mesmo nas amostras consideradas alto título, se comparado com outros trabalhos descritos na literatura (CARVALHO, 2012; CIA, 2014). Além disso, o fato de ser cana-planta contribui para a menor concentração de título bacteriano, uma vez que no capítulo anterior foi estudada a mesma variedade (CB49-260), mas em cana-soca a qual apresentou o dobro de células de Lxx em amostras de alto título. Não foi possível fazer a quantificação das amostras “alto título” com 365 dias devido a perda de material vegetal durante a extração de DNA, o que fez com que houvesse menos repetições biológicas.

A patogenicidade da Lxx está diretamente relacionado a quantidade de bactéria nas plantas e a influência de outros fatores aos quais a planta pode ser submetida, como estresses bióticos e abióticos (BAILEY, 1997; CIA et al., 2018; MCFARLANE, 2002; ZEKARIAS et al., 2012). Além disso, a evolução dos sintomas é lenta devido o comportamento fastidioso da bactéria (CARVALHO, 2012).

5.3.2. Análises tecnológicas do caldo de cana-de-açúcar

A pureza do caldo indica o estado de qualidade da matéria-prima, quanto maior a pureza, melhor é a qualidade da matéria-prima para a recuperação do açúcar. Esse parâmetro é calculado através de outros dois fatores, o brix%caldo e a pol%caldo. O brix%caldo representa o teor de sólidos solúveis presentes no caldo, esses sólidos são constituídos pelos açúcares (sacarose, glicose e frutose) e todos os demais sólidos considerados não-açúcares. A medida é utilizada para avaliar a maturidade da cana-de-açúcar (que deve ser igual ou superior a 18° Brix) e para o cálculo de pol%caldo e pureza. A pol%caldo indica a porcentagem aparente de sacarose contida no caldo, quanto maior esse parâmetro, melhor para a indústria. Recomenda-se que uma matéria-prima de qualidade deve apresentar um valor de pol%caldo igual ou maior que 14% (AMORIM et al., 2004). Canas-de-açúcar com baixos valores de brix%caldo, pol%caldo e pureza prejudicam o rendimento industrial e a qualidade do produto final obtido (DOJAS; BATISTA; MARQUES, 2009). Os valores obtidos para brix%caldo, pol%caldo e pureza estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18. Valores de brix%caldo, pol%caldo e pureza (%), determinados segundo o Manual Consecana, para caldo de cana-planta com alto e baixo título de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, da variedade CB49-260

Variedade	Tratamento	Brix%caldo	Pol%caldo	Pureza (%)
CB49-260	Alto Título	17,5 ^a ± 0,87	14,8 ^a ± 0,91	84,8 ^a ± 1,09
CB49-260	Baixo Título	17,5 ^a ± 0,62	13,6 ^b ± 0,54	77,8 ^b ± 1,19

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Não houve variação nos teores de brix%caldo, enquanto que a pol%caldo e a pureza foram estatisticamente maiores nas amostras com alto título de Lxx. Ao avaliarem os efeitos da infecção por Lxx na composição do caldo, Roussel e Corcodel (2010) também não observaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos teores de brix%caldo, enquanto que, para pol%caldo e pureza aparente do caldo, os caldos com as maiores porcentagens de feixes vasculares colonizados por Lxx, apresentaram maiores porcentagens para ambos os parâmetros, mas sem diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos para pol%caldo. Zhang e colaboradores (2016b) não obtiveram diferença estatística ($p < 0,05$) entre o brix de amostras infectadas com Lxx e a sadias.

De maneira geral, as concentrações de açúcares tendem a diminuir em plantas com maiores incidências da presença de patógenos, uma vez que, o açúcar é um dos principais componentes na biossíntese de compostos que auxiliam na defesa das plantas (MADALENO, 2010). Ademais, alguns estudos já indicaram que certos parâmetros fotossintéticos são afetados pelo RSD, o que diminui as taxas fotossintéticas e portanto a quantidade de produtos sintetizados através desta via (ZHANG et al., 2016a, 2016b; ZHU et al., 2019).

No entanto, a maior porcentagem obtida para pol%caldo, nas amostras com alto título de Lxx, pode ter ocorrido devido uma concentração dos sólidos contidos nos colmos em decorrência do menor deslocamento de água. A diminuição na translocação de água devido a deposição de gomas e formação de tiloses pelo já foi e descrita e comprovada por diversos autores (GILLASPIE; DAVIS; WORLEY, 1973; KAO; DAMANN JR., 1980; TEAKLE; APPLETON; STEINDL, 1978; TEAKLE; SMITH; STEINDL, 1975).

Os valores de açúcares redutores na cana (ARC) e fibra%cana são outros parâmetros essenciais para se determinar a qualidade da matéria-prima. Altas porcentagens de fibra, resultam em diminuição na eficiência de extração do caldo, além de aumentar o desgaste dos equipamentos (BOVI; SERRA, 1999), enquanto que, valores altos de açúcares redutores podem interferir na recuperação do açúcar (AMORIM et al., 2004). O ATR é o cálculo realizado para determinar todo o açúcar (sacarose, frutose e glicose) contido na cana-de-açúcar e através dele pode-se realizar o pagamento para os produtores de cana-de-açúcar (AMORIM et al., 2004). Os valores obtidos para ARC, fibra%cana e ATR estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19. Valores de ARC (%), fibra%cana e ATR (Kg/ton), determinados segundo o Manual Consecana, para caldo de cana-planta com alto e baixo título de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, da variedade CB49-260

Variedade	Tratamento	ARC (%)	Fibra%cana	ATR (Kg/ton)
CB49-260	Alto Título	0,63 ^b ± 0,04	10,9 ^a ± 0,59	128,9 ^a ± 6,53
CB49-260	Baixo Título	0,83 ^a ± 0,04	11,2 ^a ± 0,37	120,4 ^b ± 3,71

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

As amostras com alto título de Lxx apresentaram valores estatisticamente ($p < 0,05$) menores para ARC (Tabela 19). Roussel e Corcodel (2010) também observaram níveis significativamente menores de açúcares redutores ($p < 0,05$) conforme havia o aumento da porcentagem de feixes vasculares colonizados por Lxx em variedade suscetível ao RSD. Outras pragas foram associadas a redução de açúcares redutores como: plantas infectadas com cigarrinhas-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*) (RAVANELI et al., 2011) e pela presença do pulgão *Ceratovacuna lanigera* (do inglês: *Sugarcane woolly aphid*) (MUKUNTHAN et al., 2008). No entanto, outras doenças que acometem a cultura da cana-de-açúcar promoveram o aumento de açúcares redutores como: a broca *Diatraea saccharalis* (DINARDO-MIRANDA et al., 2012), o vírus do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (do inglês: *Sugarcane yellow leaf virus* - ScYLV) (FONTANIELLA et al., 2003; GONÇALVES et al., 2005) e o mosaico da cana-de-açúcar (do inglês: *Sugarcane mosaic virus* - SCMV) (VISWANATHAN; BALAMURALIKRISHNAN, 2005). A presença dos açúcares redutores pode prejudicar a fabricação do açúcar, ao reagirem com aminoácidos via reação de *Maillard* e favorecer a formação de compostos indesejáveis que promovem o aumento de cor (melanoidinas), além disso, a recuperação de açúcar pode ser menos eficiente devido a presença de açúcares redutores no xarope (RIPOLI; RIPOLI, 2004; ROBERTSON et al., 1996).

A menor concentração de açúcares redutores nas amostras com maior título de Lxx, pode ser decorrência do consumo de glicose como fonte de carbono para o crescimento da bactéria (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004; ROSA, 2006). Uma vez que através da Figura 18 pode-se notar um crescimento gradual da bactéria ao longo do experimento.

O teor de fibra%cana foi menor nas amostras com alto título bacteriano, porém sem apresentar diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 19). O mesmo foi observado por Jayaratne e Widanapathirana. Brumatti (2010) alega que o teor de fibra da cana-de-açúcar não é influenciado pela inoculação com Lxx, mas sim pela quantidade de sucessivos cortes. O conteúdo de fibra também não mostrou diferenças significativas entre as plantas infectadas e não infectadas para o vírus da folha amarela da cana-de-açúcar (ScYLV) (VASCONCELOS et al., 2007) e para a escaldadura das folhas (*Xanthomonas albilineans*) (HOY; GRISHAM, 1994). Outras doenças associadas com a cultura da cana-de-açúcar foram associadas ao aumento nos teores de fibra no colmo como: a infecção pela cigarrinhas-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*) (DINARDO-

MIRANDA; FERREIRA; CARVALHO, 2000; GONÇALVES et al., 2003; MADALENO, 2010). O colmo da cana-de-açúcar pode ser basicamente dividido em duas porções, o caldo que é constituído por água e sólidos solúveis (açúcares e não-açúcares) e pelos sólidos insolúveis em água, representados pela fibra (FERNANDES, 2003). Variedades de cana-de-açúcar com baixos teores de fibra tendem a ser mais suscetíveis a quebra devido a chuvas fortes e vento e a danos mecânicos ocasionados durante o corte e transporte, sendo recomendados valores entre 11 e 13% (RIPOLI; RIPOLI, 2004).

Os valores de ATR foram estatisticamente maiores ($p < 0,05$) nas amostras com alto título de Lxx (Tabela 19). Uma vez que o cálculo de ATR considera os valores obtidos para pol%caldo, era esperado um maior ATR para as amostras com alto título de Lxx. O aumento de ATR associado a infecção de Lxx já foi relatado anteriormente por outros autores (BAILEY; BECHET, 1986; GRISHAM; JOHNSON; VIATOR, 2009).

5.3.3. Análises físico-químicas do caldo de cana-de-açúcar

A cor e a turbidez do caldo impactam diretamente na cor e comercialização do açúcar produzido. O uso de açúcares com alto índices de cor pode ser extremamente prejudicial para a produção de produtos que têm como diferencial, baixa cor ou transparência (OGANDO, 2019; OLIVEIRA; ESQUIAVETO; SILVA, 2007). O pH do caldo não é um fator mensurado e avaliado como qualidade da matéria-prima, contudo, seu acompanhamento é extremamente necessário, uma vez que a acidez pode promover a inversão da sacarose (CHOU et al., 2006). Além disso, o pH pode influenciar nas reações não-enzimática que promovem o aumento de cor do caldo (ESKIN; H.M. TOWNSEND, 1971). Os valores obtidos para pH, cor ICUMSA e turbidez estão descritos na Tabela 20.

Tabela 20. Valores de pH, cor ICUMSA (U.I.) e turbidez (NTU), para caldo de cana-planta com alto e baixo título de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, da variedade CB49-260

Variedade	Tratamento	pH	Cor ICUMSA (U.I)	Turbidez (NTU)
CB49-260	Alto Título	6,11 ^b ± 0,16	2715,36 ^b ± 379,18	1060 ^b ± 30,22
CB49-260	Baixo Título	6,35 ^a ± 0,15	11074,76 ^a ± 569,21	1222 ^a ± 38,25

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

As amostras com alto título de Lxx apresentaram menores valores para pH, cor ICUMSA e turbidez. Em todos os casos houve diferença estatística entre os tratamentos.

Roussel e Corcodel (2010) não obtiveram diferença significativa entre o pH de caldos de cana-de-açúcar infectadas com Lxx e sadias. Reduções de pH do caldo já foram relatadas para cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*) (MADALENO, 2010; MADALENO et al., 2008; RAVANELI et al., 2011).

A cor do caldo de cana-de-açúcar é influenciada pela presença de compostos fenólicos (GODSHALL, 1999), desta forma, quanto menor a concentração de compostos fenólicos menor tende ser a cor do caldo. De maneira geral, quanto maior os danos ou presença de um patógeno, maior tende a ser a concentração de compostos fenólicos, como uma forma de defesa da planta (TAIZ; ZEIGER, 2004), deste modo era esperado um aumento de cor ICUMSA no caldo com a maior concentração de Lxx. Estudos relacionando a presença do RSD com parâmetros físico-químicos do caldo, como cor ICUMSA e turbidez ainda têm pouca divulgação. A menor turbidez em amostras com alto título provavelmente acompanhou a tendência da cor ICUMSA, sendo também menor nas amostras com alto título de Lxx. Quanto maior a quantidade de impurezas dispersas no caldo de cana-de-açúcar maior tende ser a turbidez e cor. Tais impurezas podem vir a interferir no processo de produção do açúcar, uma vez que podem causar problemas com a transferência de calor nos evaporadores (EGGLESTON et al., 2014; REIN, 2007).

Os compostos fenólicos são um grupo do metabolismo secundário das plantas e possuem diversas funções, podendo contribuir para a pigmentação das plantas, flores e frutos, atuam na proteção contra a luz UV, participam de reações de mecanismos de defesa, entre outros (NACZK; SHAHIDI, 2006; ZHAO et al., 2008). Durante a patogênese ocorre a biossíntese de alguns compostos fenólicos pela ação da enzima fenilalanina amônia liase (do inglês: *phenylalanine ammonia lyase* - PAL) o que aumenta os níveis de compostos fenólicos nas plantas (SANTIAGO et al., 2009). Muitos dos compostos fenólicos passam a incorporar o caldo de cana-de-açúcar após o processo de extração. Além disso, durante a extração do caldo pode ocorrer a oxidação desses compostos fenólicos, promovendo o escurecimento do caldo (BUCHELI; ROBINSON, 1994). Quando não eliminados durante o processo de clarificação, os compostos fenólicos podem permanecer no açúcar produzido e promover o aumento da cor, o que reduz a qualidade do produto e impacta na sua comercialização (CHEN; CHOU, 1993). As concentrações de fenólicos totais e flavonóides totais estão descritas na Tabela 21.

Tabela 21. Valores de fenólicos totais (g L⁻¹) e flavonóides totais (g L⁻¹), para caldo de cana-planta com alto e baixo título de *Leifsonia xylis* subsp. *xylis*, da variedade CB49-260

Variedade	Tratamento	Fenólicos totais (g L ⁻¹)	Flavonóides totais (g L ⁻¹)
CB49-260	Alto Título	653,37 ^b ± 58,29	59,91 ^b ± 15,54
CB49-260	Baixo Título	840,19 ^a ± 85,05	100,72 ^a ± 15,15

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Os teores de fenólicos e flavonóides totais foram estatisticamente menores nas amostras com alto título de Lxx. Roussel e Corcodel (2010) não obtiveram diferenças estatísticas para fenólicos totais em caldos com diferentes porcentagem de feixes vasculares colonizados por Lxx. Estudos relacionando os teores de compostos fenólicos totais em caldo com RSD ainda são poucos, enquanto que, outras pragas e doenças que acometem a cultura da cana-de-açúcar já são mais difundidos na literatura. No caso da cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*), Madaleno et al. (2008), Ravaneli et al. (2010) e Madaleno (2010) observaram um aumento nas concentrações de fenólicos totais do caldo com o aumento da incidência da praga. Para escaldadura das folhas (*Xanthomonas albilineans*), Fontaniella et al. (2007) obtiveram maiores concentrações de ácidos fenólicos totais em caldo de plantas infectadas para duas cultivares.

O acúmulo compostos fenólicos e flavonóides na cana-de-açúcar está relacionado a mecanismos de defesa, desta forma, quanto maiores os danos ou a presença do patógeno, maior tendem a ser as concentrações desses compostos (FONTANIELLA et al., 2003), contudo, as amostras com alto título de Lxx apresentaram menores concentrações tanto para compostos fenólicos totais, quanto para flavonóides totais, isso provavelmente ocorreu devido a quantidade baixa de Lxx, uma vez que não houve inoculação direta neste experimento e ao fato de serem plantas de primeiro corte. Os danos causados pelo RSD tendem a ser progressivamente mais severos ao decorrer das sucessivas socas, além disso, eles também estão diretamente relacionados a quantidade de DNA bacteriano nas plantas (BAILEY; BECHET, 1986; DAVIS; DEAN; HARRISON, 1988; HOY; GRISHAM; DAMANN JR., 1999; ZEKARIAS et al., 2012).

O fato das amostras com baixo título bacteriano terem apresentado as maiores concentrações de compostos fenólicos e flavonóides totais (Tabela 21) pode ter influenciado nos menores teores de pol%caldo (Tabela 18), uma vez que perdas nos teores de açúcar podem ocorrer devido a sua utilização para a biossíntese de compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Além disso, a maior concentração de compostos fenólicos pode ter favorecido os maiores índices de cor ICUMSA e turbidez (Tabela 20), já que os compostos fenólicos são um dos principais responsáveis pelo aumento de cor no caldo de cana-de-açúcar (BUCHELI; ROBINSON, 1994; CLARKE; LEGENDRE, 1999).

5.3.4. Atividades enzimáticas em caldo de cana-de-açúcar

A peroxidase (POD) e a polifenoloxidase (PPO) são enzimas presentes nas plantas em geral e são responsáveis pela oxidação dos compostos fenólicos transformando-os em suas respectivas quinonas. A oxidação enzimática dos compostos fenólicos pelas enzimas tem sido associada ao escurecimento enzimático nos tecidos das plantas (VÁMOS-VIGYÁZÓ; HAARD, 1981; WHITEHEAD; DE SWARDT, 1982) e ao escurecimento do caldo de cana-de-açúcar (BUCHELI; ROBINSON, 1994; MANOHAR; HARISH NAYAKA, 2014; RAMPAZO, 2011), sendo que a PPO é a enzima principal que atua sobre os compostos fenólicos e promove o escurecimento do caldo (BUCHELI; ROBINSON, 1994; ZHAO et al., 2011). Os valores obtidos para a atividade da peroxidase e polifenoloxidase no caldo estão descritos na Tabela 22.

Tabela 22. Valores de atividade da peroxidase (U mL⁻¹) e polifenoloxidase (U mL⁻¹) para caldo de cana-planta com alto e baixo título de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, da variedade CB49-260

Variedade	Tratamento	Peroxidase (U mL ⁻¹)	Polifenoloxidase (U mL ⁻¹)
CB49-260	Alto Título	229,98 ^a ± 31,94	19,94 ^a ± 3,52
CB49-260	Baixo Título	230,69 ^a ± 57,46	16,13 ^a ± 10,86

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Amostras com alto título de Lxx apresentaram uma menor atividade enzimática para POD e maior para PPO, contudo, em nenhum dos casos houve diferença estatística ($p < 0,05$), mostrando que a quantidade de título de Lxx não foi suficiente para afetar nas atividades enzimáticas.

A atividade enzimática da POD no caldo foi superior a atividade enzimática da PPO. Bucheli e Robinson (1994) que em caldo de cana-de-açúcar a atividade da POD tende a ser é maior do que a da PPO. Em geral, durante o estágio de maturação das plantas a atividade enzimática da POD tende a aumentar, enquanto que a atividade da PPO diminui, devido às alterações sofridas na parede celular (AZEVEDO et al., 2009; MATTOO; MODI, 1969). A ação das enzimas POD e PPO ocorre sobre compostos fenólicos, convertendo-os em quinonas, as quais podem promover o escurecimento do caldo, dificultar a cristalização e resultar em menores rendimentos de açúcar, menor qualidade e aumento dos custos de refino (JIMENEZ; SAMANIEGO, 1981).

5.3.5. Avaliação do teor de lignina do bagaço de cana-de-açúcar

No processo de extração são obtidas uma fração líquida (caldo) e uma fração sólida (bagaço). A partir da fração sólida é determinado o peso do bolo úmido (PBU), o qual posteriormente é utilizado para determinação do teor de fibra (FARIAS et al., 2009). A lignina é um dos principais componentes da fibra do bagaço da cana-de-açúcar, ela é responsável por conferir sustentação a cana-de-açúcar e proteção contra o ataque de microrganismos (FENGEL; WEGENER, 1989). Os valores de lignina total do PBU estão descritos na Tabela 23.

Tabela 23. Valores de lignina total do PBU de cana-planta com alto e baixo título de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, da variedade CB49-260

Variedade	Tratamento	Lignina total (%)
CB49-260	Alto Título	20 ^a ± 0,01
CB49-260	Baixo Título	16 ^a ± 0,07

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

As amostras com alto título de Lxx apresentaram maior porcentagem de lignina total, no entanto, não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos, o que mostra que as concentrações de Lxx não foram altas o suficiente a ponto de causar diferenças significativas entre as porcentagens de lignina total.

A maior porcentagem de lignina total nas amostras com alto título de Lxx pode ser resultado da oxidação de compostos fenólicos pela ação da enzima polifenoloxidase, uma vez que as amostras com maior concentração de Lxx, apresentaram menores concentrações de compostos fenólicos (Tabela 21) e maior atividade da enzima polifenoloxidase (Tabela 22). Segundo Li et al. (2019) a polifenoloxidase está envolvida principalmente na oxidação de fenóis para a polimerização de compostos que são precursores de lignina. Cia (2014) observou que o gene que a codifica a enzima fenilalanina amônia liase (do inglês: *phenylalanine ammonia lyase* - PAL) foi mais expresso em plantas inoculadas com Lxx. A PAL é a primeira enzima a participar da síntese de lignina (CIA et al., 2018; GUIDI et al., 2004; NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). Embora a atividade da PAL não tenha sido mensurada neste trabalho, isso poderia explicar também a menor concentração de compostos fenólicos e maior teor de lignina total nas amostras com alto título de Lxx.

5.4. Conclusão

A doença não aparentou reduzir a qualidade da cana-planta, uma vez que, amostras com os maiores títulos de Lxx apresentaram valores estatisticamente maiores para pol%caldo, pureza e açúcares totais recuperáveis representando que o maior título bacteriano esteve associado plantas com melhores qualidades do ponto de vista industrial. Além disso, o maior título de Lxx foi associado a valores estatisticamente menores para açúcares redutores%cana, pH, cor ICUMSA, turbidez, fenólicos totais e flavonóides totais. As atividades enzimáticas da peroxidase e da polifenoloxidase e a porcentagem de lignina total do bagaço não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, mostrando que a quantidade de bactéria nas amostras não foi suficiente para influenciar esses parâmetros. A maior concentração de fenólicos e flavonóides totais, pode ter influenciado nas menores porcentagens de pol%caldo e nos maiores índices de cor ICUMSA e turbidez nas amostras com menores títulos bacterianos.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V. et al. Qualidade da cana-de-açúcar e seu impacto na indústria. In: RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C. (Eds.). **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. 1. ed. Piracicaba: Barros e Marques
- AZEVEDO, K. P. et al. Caracterização física e enzimática em diferentes estádios de desenvolvimento da fruta de uvaieira (*Eugenia Pyriformis* Cambess), cultivada no Triângulo Mineiro. **II Seminário Iniciação Científica – IFTM**, p. 1–7, 2009.
- BAILEY, R. A.; BECHET, G. R. Effect of ratoon stunting disease on the yield and components of yield of sugarcane under rainfed conditions. **Proceedings of the South African Sugar Technologist's Association**, v. 60, p. 143–147, 1986.
- BOVI, R.; SERRA, G. E. Impurezas fibrosas da cana-de-açúcar e parâmetros tecnológicos do caldo extraído. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 885–896, 1999.
- BRAZ, H. **Garapa boa deve vir de cana apropriada**. O Estado de São Paulo, 2003.
- BRUMATTI, C. R. **Comportamento de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em inoculações com diferentes concentrações de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, 2010.
- BUCHELI, C. S.; ROBINSON, S. P. Contribution of enzymic browning to color in sugarcane juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 257–261, 1994.
- CALDAS, C. S. **Escurecimento do açúcar branco: influência do processo e do tempo de armazenamento**. 2012. 90 f. Tese (Doutorado em Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco, 2012.
- CARNEIRO-JUNIOR, J. B. **Efeito do tratamento térmico e da inoculação de bactérias endofíticas no controle do raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar**. 2006. 92 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006.
- CARVALHO, G. DE. **Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras**. 2012. 144 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2012.
- CHEN, J. C. P.; CHOU, C. C. **A manual for cane sugar manufactures and their chemists**. 12ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1993.
- CHOU, C. C. et al. SAT process as a replacement for sulfitation in mill white sugar production. **International Sugar Journal**, v. 108, n. 1289, p. 247–253, 2006.

- CIA, M. C. **Análise transcritômica de plantas de cana de açúcar inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo das soqueiras**. 2014. 105 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2014.
- CIA, M. C. et al. Novel insights into the early stages of ratoon stunting disease of sugarcane inferred from transcript and protein analysis. **Genetics and Resistance**, v. 108, p. 1455–1466, 2018.
- CLARKE, M. A.; LEGENDRE, B. R. Qualidade da cana-de-açúcar: Impactos no rendimento do açúcar e fatores da qualidade. **Soc. Tec. Açúc. Alco. Bras., Açúc. Alco. Subprod.**, v. 17, n. 6, p. 36–40, 1999.
- COMSTOCK, J. C. Ratoon stunting disease. **Sugar Tech**, v. 4, n. 1–2, p. 1–6, 2002.
- CONSECANA. **Manual de instruções CONSECANA-SP**. 6. ed. Piracicaba: CONSECANA-SP, 2015.
- COPERSUCAR. Métodos Analíticos. In: COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA. (Ed.). **Manual de controle químico da fabricação de açúcar**. Piracicaba: [s.n.]. 2001. 57 p.
- DAVIS, M. J.; DEAN, J. L.; HARRISON, N. A. Quantitative variability of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* populations in sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, v. 78, n. 4, p. 462–468, 1988.
- DINARDO-MIRANDA, L. L. et al. Influência da infestação de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) sobre parâmetros tecnológicos da cana-de-açúcar. **Bragantina**, v. 342, n. 3, p. 342–345, 2012.
- DINARDO-MIRANDA, L. L.; FERREIRA, J. M. G.; CARVALHO, P. A. M. Influência da cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata*, sobre a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 19, n. 2, p. 34–35, 2000.
- DOJAS, F.; BATISTA, V. L.; MARQUES, M. O. Qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de açúcar. **Nucleus**, v. Ed. Especi, p. 59–66, 2009.
- EGGLESTON, G. et al. Improved control of sucrose losses and clarified juice turbidity with lime saccharate in hot lime clarification of sugarcane juice and other comparisons with milk of lime. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 1, p. 311–325, 2014.
- ESKIN, N. A. M.; H.M. TOWNSEND, R. J. H. **Biochemistry of foods**. New York: Academic Press, 1971.
- FARIAS, C. H. D. A. et al. Qualidade industrial de cana-de-açúcar sob irrigação e adubação com zinco, em Tabuleiro Costeiro paraibano. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 4, p. 419–428, 2009.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

- FERNANDES, A. C. **Cálculos na agroindústria canavieira**. 2ed. ed. Piracicaba: STAB - Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, 2003.
- FERRAZ, A.; MENDONÇA, R.; DA SILVA, F. T. Organosolv delignification of white- and brown-rotted *Eucalyptus grandis* hardwood. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 18–24, 2000.
- FONTANIELLA, B. et al. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 11–12, p. 1027–1036, nov. 2003.
- FONTANIELLA, B. et al. Effect of leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) on polyamine and phenolic acid metabolism of two sugarcane cultivars. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 4, p. 401–409, 2007.
- GILLASPIE, A. G. . J.; DAVIS, R. E.; WORLEY, J. F. Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of a specific micro-organism. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n. 12, p. 987–990, 1973.
- GODSHALL, M. A. Removal of colorants and polysaccharides and the quality of white sugar. **Proceedings of sixth international symposium organized by association Andrew van Hook (AvH)**, 1999.
- GONÇALVES, M. C. et al. Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 10–16, 2005.
- GONÇALVES, T. D. et al. Qualidade da matéria prima em função de diferentes níveis de danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 22, n. 2, p. 29–33, 2003.
- GRISHAM, M. P.; JOHNSON, R. M.; VIATOR, R. V. Effect of ratoon stunting disease on yield of recently released sugarcane cultivars in Louisiana. **Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists**, v. 29, p. 119–127, 2009.
- GUIDI, L. et al. Photosynthetic process and activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in resistant and sensitive genotypes of *Lycopersicon esculentum* L. exposed to ozone. **Plant Science**, v. 168, p. 153–160, 2004.
- HOLSCHUH, H. J. **Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase em carambola (*Averrhoa carambola*, L.)**. 2000. 159 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, 2000.
- HOY, J. W.; GRISHAM, M. P. Sugarcane leaf scald distribution, symptomatology, and effect on yield in Louisiana. **Plant Disease**, v. 78, n. 11, p. 1083–1087, 1994.

- HOY, J. W.; GRISHAM, M. P.; DAMANN JR., K. E. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. **Plant Disease**, v. 83, n. 12, p. 1170–1175, 1999.
- ICUMSA. Method G.S. 2/3-9. The determination of sugar solution colour at 7.0 – Accepted. In: **International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis**. 2011.
- JAMES, G. A review of ratoon stunting disease. **International Sugar Journal**, v. 98, p. 1174, 1996.
- JAYARATNE, D. L.; WIDANAPATHIRANA, S. Ratoon stunting disease of sugarcane in Sri Lanka. **J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka**, v. 15, n. 2, p. 227–236, 1987.
- JIMENEZ, P. O.; SAMANIEGO, R. L. Enzymic browning in cane juice. **Crystallizer**, v. 4, p. 10–11, 1981.
- JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: Methods for the analysis of certain phenolics. **J. Agric. Food Chem.**, v. 33, n. 2, p. 213–217, 1985.
- KAO, J.; DAMANN JR., K. E. In situ localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. **Canadian Journal of Botany**, v. 58, n. 3, p. 310–315, fev. 1980.
- KAZEEM, S. A.; IKOTUN, B. Effect of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* on growth and yield of sugarcane in Nigeria. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, n. 3, p. 587–595, 2019.
- KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 49, p. 407–410, 1994.
- LEAL, J. E. T. et al. Influência da cigarrinha-das-raízes *Mahanarva Fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) e seus métodos de controle sobre a produtividade e a qualidade da cana-de-açúcar. **Nucleus**, v. Ed, n. Esp, p. 55–64, 2008.
- LI, Y.-R. et al. Effect of sugarcane smut (*Ustilago scitaminea* Syd.) on ultrastructure and biochemical indices of sugarcane. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 17, n. 1, p. 12546–12551, 2019.
- LIMA, E. D. P. DE A.; PASTORE, G. M.; LIMA, C. A. DE A. Purificação da enzima polifenoloxidase (PFO) de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 21, n. 1, p. 98–104, 2001.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. Reagents and procedures for the ultraviolet spectral analysis of flavonoids. In: **The Systematic Identification of Flavonoids**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1970. p. 35–40.
- MADALENO, L. L. et al. Influence of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) injury on the quality of cane juice. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 68–73, 2008.

- MADALENO, L. L. **CIGARRINHA-DAS-RAÍZES NA CANA-DE-AÇÚCAR E QUALIDADE DO AÇÚCAR PRODUZIDO**. 2010. 80 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, 2010.
- MANOHAR, M. P.; HARISH NAYAKA, M. A. Studies on phenolic content and polyphenol oxidase activity of sugarcane varieties with reference to sugar processing. **Sugar Tech**, v. 16, n. 4, p. 385–391, 2014.
- MATTOO, A. K.; MODI, V. V. Ethylene and ripening of mangoes. **Plant Physiol**, v. 44, p. 308–310, 1969.
- MUKUNTHAN, N. et al. Assessment of woolly aphid impact on growth, yield and quality parameters of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 10, n. 2, p. 143–149, 2008.
- MUTTON, M. J. R. **Reflexos da qualidade da matéria-prima no processo industrial**. II Simpósio Internacional da STAB – Perdas de açúcares: do campo ao produto final. **Anais...Águas de São Pedro**: 2003
- MUTTON, M. J. R. **Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica**. Produção de etanol: Qualidade de matéria-prima. **Anais...Lorena**: maio 2008
- NACZK, M. ; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 5, p. 523–542, 2006.
- NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 30, p. 369–389, 1992.
- NYALUGWE, E. P. et al. Systemic hypersensitive resistance to *Turnip mosaic virus* in *Brassica juncea* is associated with multiple defense responses, especially phloem necrosis and xylem occlusion. **Plant Disease**, v. 100, n. 7, p. 1261–1270, 2016.
- OGANDO, F. I. B. **Aplicação da eletrocoagulação na purificação e clarificação do caldo de cana-de-açúcar**. 2019. 138 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2019.
- OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2013.
- OKTAY, M. et al. Polyphenoloxidase from Amasya Apple. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 3, p. 494–496, 1995.

- OLIVEIRA, D. T.; ESQUIAVETO, M. M. M.; SILVA, J. F. Impacto dos itens da especificação do açúcar na indústria alimentícia. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 99–102, 2007.
- PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). . **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. p. 423–452.
- PAYET, B.; SING, A. S. C.; SMADJA, J. Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7270–7276, 2006.
- POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. **Trends in Genetics**, v. 11, n. 6, p. 217–218, 1995.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing, 2019.
- RAMPAZO, E. M. **Atividade de enzimas oxidativas em caldo de cana-de-açúcar em função do sistema de plantio**. 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade do Oeste Paulista, 2011.
- RAVANELI, G. C. **Qualidade da matéria-prima, microbiota fermentativa e produção de etanol sob ataque de *Mahanarva Fimbriolata* em cana-de-açúcar**. 2010. 90 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2010.
- RAVANELI, G. C. et al. Spittlebug impacts on sugarcane quality and ethanol production. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46, n. 2, p. 120–129, 2011.
- REIN, P. W. **Cane sugar engineering**. Bartens ed. Berlin: Bartens, 2007.
- RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. 1 ed. ed. Piracicaba: Barros e Marques Editoração Eletrônica, 2004.
- ROBERTSON, M. J. et al. Accumulation of reducing sugars by sugarcane: effects of crop age, nitrogen supply and cultivar. **Field Crops Research**, v. 49, p. 39–50, 1996.
- ROUSSEL, C.; CORCODEL, L. Evaluation of a reunionese variety infected by ratoon stunting disease. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol**, v. 27, p. 1–6, 2010.
- RUTHERFORD, R. S. Mechanisms of resistance to pests and pathogens in sugarcane and related crop species. In: MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. (Eds.). . **Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2013. p. 435–482.

- SANT'ANNA, C. et al. Sugarcane cell wall structure and lignin distribution investigated by confocal and electron microscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 8, p. 829–834, ago. 2013.
- SANTIAGO, R. et al. Changes in phenolic acids content, phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in sugarcane leaves induced by elicitors isolated from *Xanthomonas albilineans*. **Australasian Plant Pathology Society**, v. 38, p. 357–365, 2009.
- SARTORI, J. A. DE S. **Qualidade físico-química da cana-de-açúcar e microbiológica do caldo sobre o processo de ozonização do caldo na redução sustentável da cor ICUMSA e impurezas vegetais**. 2017. 128 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2017.
- SILVA, R.; REIS, V. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. **Embrapa Agrobiologia**, 49 p., 2008.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TEAKLE, D. S. S.; APPLETON, J. M.; STEINDL, D. R. L. R. L. An anatomical basis for resistance of sugar cane to ratoon stunting disease. **Physiological Plant Pathology**, v. 12, n. 1, p. 83–91, 1978.
- TEAKLE, D. S.; SMITH, P. M.; STEINDL, D. R. L. Ratoon stunting disease of sugarcane: Possible correlation of resistance with vascular anatomy. **Phytopathology**, v. 65, p. 138–141, 1975.
- TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. F. A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Vol 2**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. p. 219–231.
- VÁMOS-VIGYÁZÓ, L.; HAARD, N. F. Polyphenol oxidases and peroxidases in fruits and vegetables. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 49–127, 1981.
- VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, p. 259–288, 1980.
- VASCONCELOS, A. C. M. et al. Effects of sugarcane yellow leaf virus infection on sugarcane yield and root system development. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.**, v. 26, p. 1051–1056, 2007.
- VISWANATHAN, R.; BALAMURALIKRISHNAN, M. Impact of mosaic infection on growth and yield of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 7, p. 61–65, 2005.

- WHITEHEAD, C. S.; DE SWARDT, G. H. Extraction and activity of polyphenoloxidase and peroxidase from senescing leaves of *Protea neriifolia*. **South African Journal of Botany**, v. 1, n. 4, p. 127–130, 1982.
- WOO, K. S. et al. Characteristics of the thermal degradation of glucose and maltose solutions. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 20, n. 2, p. 102–109, 2015.
- ZEKARIAS, Y. et al. Effect of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* concentration on yields of four sugarcane varieties in the sugarcane plantations of Ethiopia. **Ethiopian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 25–30, 2012.
- ZHANG, X. et al. Morphological and physiological responses of sugarcane to *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* infection. **Plant Disease**, v. 100, n. 12, p. 2499–2506, 2016a.
- ZHANG, X. Q. et al. Influence of inoculation of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* on photosynthetic parameters and activities of defense enzymes in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 19, n. 4, p. 1–8, 2016b.
- ZHAO, Z.-G. et al. Simultaneous determination of ten major phenolic acids in sugarcane by a reversed phase HPLC method. **Sugar Industry**, v. 133, p. 1–7, 2008.
- ZHAO, Z. G. et al. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Zuckerindustrie**, v. 136, n. 5, p. 296–301, 2011.
- ZHU, K. et al. The physiological characteristics and associated gene expression of sugar cane inoculated with *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 1, p. 44–52, 2017.
- ZHU, K. et al. Functional analysis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* membrane protein gene Lxx18460 (anti-sigma K) . **BMC Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 1–12, 2019.