

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

Estudo químico e biológico da interação dos microrganismos causadores de
podridão em cana-de-açúcar

Gislene Roberta Manarim

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

Piracicaba
2023

Gislene Roberta Manarim
Engenheira Agrônoma

**Estudo químico e biológico da interação dos microrganismos causadores de podridão em
cana-de-açúcar**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **SIMONE POSSELENTE DE LIRA**

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

Piracicaba
2023

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

Manarim, Gislene Roberta

Estudo químico e biológico da interação dos microrganismos causadores de podridão em cana-de-açúcar / Gislene Roberta Manarim. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

74 p.

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

1. *Fusarium verticillioides* 2. *Colletotrichum falcatum* 3. Controle biológico 4. Compostos especializados I. Título

AGRADECIMENTOS

A Prof^ª. Dr^ª. Simone Possedente de Lira, por me acolher em tempo que não existia chão, por acreditar na minha capacidade de recomeçar e por ser exemplo de mulher, cientísta e orientadora que levarei eternamente em minha vida.

A minha mãe, Silvia Aparecida Setem, pela vida, pelos puxões de orelha, pelos melhores direcionamentos, por cuidar tão bem de mim, por acreditar em mim, por me dar amor incondicional e me mostrar os valores da persistência e da compaixão. Te amo demais!

Ao meu pai, Paulo Cherles Manarim, pela vida, por sem mais presente, pelos papos de domingo, mesmo que a distância, e pelo recomeço.

A minha irmã preferida, e única, Luana Kellen Manarim, pela amizade, pela disponibilidade, por ser meu chão, por ser minha confidente, por ser a melhor irmã que existe nesse mundo. Ao meu cunhado Mauro Ribeiro da Silva Júnior, pela paciência, pelo papel de irmão, que eu nunca tive, e pelas conversas sobre futuro. Amo vocês pelo maior presente que vocês me deram, a pessoa mais importante da minha vida, meu amado sobrinho e afilhado Denis Manarim Ribeiro da Silva. Denis, com você, durante esses 4 anos, bem vividos, eu aprendi o que é amar, o que é a paciência, o que é abrir mão das coisas, o que é ser feliz, o que é querer um futuro melhor. Te amo mais que a mim mesma, você é extremamente importante para mim.

Ao meu marido, Luis Fernando Recchia Bombo, por todo amor, por acreditar no meu potencial, por me apoiar nas loucuras, por criar infinitos objetivos comigo, correr atrás de tudo, se preocupar se meu dia está sendo bom, por se dedicar em me fazer feliz todos os dias. Eu te amo!

A toda a minha família, que direta ou indiretamente acreditaram no meu potencial e me apoiaram nas decisões de carreira. Muito obrigada!

A minha amiga e sócia Juliana Aparecida de Souza Sartori, por sonhar junto comigo os sonhos mais loucos, por aceitar sair da zona de conforto, por acreditar no nosso potencial, por criar a to Plant comigo e trabalhar para que no futuro a nossa empresa seja referência em qualidade de produtos, serviços e aprendizado. Obrigada por ser confidente na minha vida profissional e pessoal. Estamos juntas sempre!

Aos técnicos do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Rosemary Leonessa da Silva, Sylvino Luiz Torrezan e Pedro Dorival Lucentini pelo pronto apoio nas atividades laboratoriais, por me fazerem rir, por ajudar sempre que precisei. Vocês estarão sempre no meu coração.

Ao Prof. Dr. Antonio Sampaio Baptista, por abrir as portas do seu laboratório para que eu pudesse desenvolver análises relacionadas a qualidade de cana-de-açúcar e pela prontidão em ajudar.

As minhas amigas Nathalia Torres Corrêa Magri, Juliana Lorenz Mandro Campiol, Graziela Maniero Belote, Lais Maroubo e Bruna Gomes, que mesmo passando por um ambiente pesado, por corações acelerados, por traumas acadêmicos muito profundos, ainda tiveram forças para lutar, confiança uma nas outras, finalizaram ciclos e seguem suas vidas com muito amor, felicidade e amizades. Contem sempre comigo! E que possamos ainda almoçar no shopping e rir do passado.

Aos meu colegas de laboratório, Naydja Maimone, Lucianne Paes, Gabriel Luiz Padoan Gonçalves, Mario Pozzo Júnior, Almir Moreira Gonçalves Júnior e Ana Gaiotto por me receberem tão bem no grupo, por me ensinarem mais sobre microbiologia, por me ajudarem nas experimentações e pela empolgação acadêmica que é difícil de encontrar.

Aos professores do Departamento de Ciências Exatas, Prof^a. Dr^a. Wanessa Melchert Mattos, Prof. Dr. Marcos Yassuo Kamogawa e Prof. Dr. Marcelo Eduardo Alves, pela grande ajuda com conhecimento, materiais, equipamentos, permitindo que essa tese pudesse ser conduzida em sua totalidade.

Ao Pós-Doutorando Marcos Brasil, pelo companheirismo diário, pelas trocas de experiências na área, pelos cafés e bate papos que vão além da academia.

Aos técnicos do departamento de Ciências Exatas, Felipe Gabriel Andrino, Janaina Truffi, Lenita Oliveira e Rita de Cassia Leite de Castro pelo companheirismo, pelas risadas, pelas ajudas nos experimentos e por mostrar bons caminhos profissionais.

Aos demais alunos do Departamento de Ciências Exatas, pela convivência e troca de experiências.

Ao Prof. Marcio de Castro Silva Filho, do Departamento de Genética da ESALQ/USP pela doação de culturas isoladas dos microrganismos desse trabalho.

A cooperativa Coplacana, em especial ao Tião, pela prontidão na ajuda em encontrar a melhor matéria-prima para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Lucas Sartori que doou cana-de-açúcar e ponteiro para as extrações e meios de cultura.

As minhas amigas de graduação, Ana Carolina Imthurn, Ariane Ludolf de Oliveira, Carolina Scalise, Juliana Silveira Baggio e Livia de Castro e Mello por serem quem são, por me fazerem parte desse grupo tão sensacional, por serem minhas melhores amigas, pelas

risadas diárias mesmo a distância, por me apoiarem nas minhas escolhas, por fazerem dos meus dias os melhores, por estarem comigo para o que der e vier. Eu amo vocês!

A ESALQ, pelos melhores anos da minha vida, pelo melhor conhecimento que alguém pode adquirir e por ser exemplo de escola. A escola agrícola fez, faz e sempre fará parte da minha história e da minha família. O que sou devo a gloriosa!

Ao Programa de Pós-Graduação em Micobiologia Agrícola, pelo conhecimento adquirido com os professores, pelo apoio financeiro para eventos e pelas amizades dos alunos pertencente ao melhor programa de pós-graduação!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq Processo nº 144870/2017-7, pelo apoio financeiro com bolsa de estudo e reserva técnica. Este apoio permitiu a melhor condução do projeto de pesquisa, apresentação do trabalho em congresso internacional assim como ofereceu maior conhecimento ao setor sucroenergético sobre a interação entre fungos causadores de doenças.

Por último, agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES também pela bolsa de estudo, permitindo a continuidade do projeto de doutorado.

Muito Obrigada!

“São as nossas escolhas, mais do que as nossas capacidades, que mostram quem realmente somos.”

Alvo Dumbledore

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Cana-de-açúcar	15
2.2. Complexo broca-podridão	17
2.3. Fungos causadores de podridão em cana-de-açúcar.....	19
2.4. Produtos naturais no controle de doenças de plantas	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. MATERIAL	25
3.2. MÉTODOS	25
3.2.1. Altura e diâmetro de colmos de cana-de-açúcar.....	25
3.2.2. Análises tecnológicas do caldo de cana-de-açúcar.....	25
3.2.2.1. Fibra%cana (F)	26
3.2.2.2. Brix%caldo (porcentagem em massa de sólidos solúveis).....	26
3.2.2.3. Pol%caldo (porcentagem em massa de sacarose aparente).....	26
3.2.2.4. Pureza (Q).....	26
3.2.2.5. Pol%cana (PC).....	26
3.2.2.6. AR%caldo (açúcares redutores do caldo).....	27
3.2.2.7. ARC% (açúcares redutores da cana)	27
3.2.2.8. ATR (Açúcar total recuperado)	27
3.2.3. Preparo dos meios.....	27
3.2.4. Ensaio biológico por cultivo pareado	28
3.2.5. Ensaio de cultivo biológico com incorporação de extrato microbiológico aos meios de cultura	29
3.2.6. Estudo químico de compostos especializados de extratos fúngicos.....	29
3.2.6.1. Obtenção de extratos fúngicos.....	29
3.2.6.2. Análises em UPLC-qTOF-MS/MS	30
3.2.6.3. Processamento dos dados e análises estatísticas.....	30
3.2.6.4. Perfil de metabólitos.....	31
3.2.7. Preparo do extrato foliar de ponteiro de cana-de-açúcar.....	32
3.2.8. Ensaio biológico de incorporação de fungicidas e extratos brutos de ponteiro de cana-de-açúcar em meios de cultura.....	33
3.2.9. Estudo químico de compostos especializados de extratos de ponteiro de cana-de-açúcar.....	34
3.2.9.1. Análises em UPLC-qTOF-MS/MS	34
3.2.9.2. Processamento dos dados e análises estatísticas.....	35
3.2.9.3. Perfil de metabólitos	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	63

RESUMO

Estudo químico e biológico de microrganismos causadores de podridão em cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é a terceira maior cultura em área plantada no Brasil e a principal matéria-prima para produção de açúcar, etanol e energia. Mundialmente, o Brasil é o principal produtor de cana, seguido de Índia, Tailândia e China. Cada país apresenta seus desafios em manejo para maximizar a qualidade de colmos, no entanto as podridões são comumente os sintomas mais observados nessa cultura. No estado de São Paulo, após a proibição do emprego da queima para colheita, os sintomas de doenças de podridão aumentaram. Fungos como *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides*, vem sendo observados nos diversos estádios fenológicos de desenvolvimento da cana e estão muito associados a rachadura de colmos e ataques de pragas, como a *Diatraea saccharalis*. Perante esse cenário, o objetivo foi entender as interações entre os fungos causadores de podridão em cana e propor controles químicos e biológicos contra esses fungos. Foram realizados ensaios biológicos *in vitro* em dois meios de cultura para verificar as interações entre os fungos, assim como verificar inibições químicas através da incorporação do extrato fúngico do *Colletotrichum falcatum* contra o *Fusarium verticillioides* e vice-versa. Análises em UPLC-qTOF-MS/MS dos extratos fúngicos e dos extratos de ponteiro de cana-de-açúcar foram realizadas para anotar classes químicas de compostos possivelmente inibitórios. Ainda, foram testados dois fungicidas como possíveis métodos de controle e também o uso de extrato foliar do ponteiro da cana-de-açúcar como controle biológico. Fisicamente não é possível afirmar sobre a superioridade competitiva de um fungo contra o outro. No entanto, os extratos de compostos especializados de um fungo contra o outro apresentaram resultados satisfatórios de ação fungistática. Houve anotação de classes químicas importantes para os extratos de ambos os fungos. Dentre os fungicidas estudados um apresentou controle eficiente do *Colletotrichum falcatum*, mas não houve um controle satisfatório do *Fusarium verticillioides*. O extrato do ponteiro apresentou satisfatória inibição no crescimento micelial dos fungos do complexo broca-podridão e pode ser uma opção de produto biológico. Dentre as classes químicas de compostos presentes no extratos de ponteiro de cana-de-açúcar, anotadas pelas ferramentas do GNPS e NAP, estão os flavonóides.

Palavras-chave: *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum falcatum*, Controle biológico, Compostos especializados

ABSTRACT

Chemical and biological study of interaction of microorganisms that cause rot in sugarcane

Sugarcane is the third largest crop in planted area in Brazil and the main raw material for the production of sugar, ethanol and energy. Worldwide, Brazil is the main sugarcane producer, followed by India, Thailand and China. Each country presents its management challenges to maximize the quality of stalks, however, rot is commonly the most observed symptoms in this crop. In the São Paulo state, after the prohibition on the use of burning for harvesting, the symptoms of rot diseases increased. Fungi such as *Colletotrichum falcatum* and *Fusarium verticillioides* have been observed in the different phenological stages of sugarcane development and are closely associated with stem splitting and attacks by pests such as *Diatraea saccharalis*. Given this scenario, the objective was to understand the interactions between the fungi that cause rot in sugarcane and propose chemical and biological controls against these fungi. *In vitro* biological assays were carried out in two culture media to verify the interactions between the fungi, as well as to verify the chemical interaction through the incorporation of the *Colletotrichum falcatum* fungal extract against *Fusarium verticillioides* and vice versa. UPLC-qTOF-MS/MS analyzes of the fungal extracts and sugarcane pointer extracts were performed to annotate chemical classes of inhibitory compounds. Furthermore, two fungicides were tested as possible control methods and also the use of sugarcane pointer leaf extract as biological control. Physically it is not possible to say about the competitive superiority of one fungus against the other. However, extracts of specialized compounds from one fungus against the other showed satisfactory results of fungistatic action. Important chemical classes were noted for the extracts of both fungi. Among the fungicides studied, one showed satisfactory control against *Colletotrichum falcatum*, but there was no satisfactory control of *Fusarium verticillioides*. The sugarcane pointer extract showed satisfactory inhibition of the mycelial growth of the fungi of the borer-rot complex and may be an option of a biological product. Among the chemical classes of compounds present in the extracts of sugarcane pointer, noted by the GNPS and NAP tools, are the flavonoids.

Keywords: *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum falcatum*, Biological control, Specialised compounds

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) tem uma forte importância econômica para o Brasil no mercado interno e externo. É uma matéria-prima bastante rústica e versátil gerando diversos produtos como açúcares, álcoois, xaropes, melaço, energia elétrica e biogás, por exemplo, sendo assim, essa cultura está presente diariamente no cotidiano dos brasileiros. Somos o maior produtor e exportador mundial de açúcar e etanol derivados de cana-de-açúcar. Esse mercado é responsável por movimentar mais de R\$ 100 bilhões por ano, em aproximadamente 400 usinas processadoras de cana-de-açúcar (RAIZEN, 2021).

Tamamha importância requer cuidados e atenção com a matéria-prima maximizando a produtividade. Na indústria sucroenergética os maiores desafios estão na gestão agrícola de controles de pragas e doenças. Múltiplas são as atenções na área entomológica e microbiológica da cana. Assim, empresas e institutos vem desenvolvendo melhoramento genético de cana-de-açúcar buscando minimizar danos de pragas e microrganismos. Em contra-partida a academia e empresas privadas de desenvolvimento de produtos vem buscando soluções no controle das principais pragas e doenças da cana (MAPA, 2020).

Dentre as doenças de destaque da cana-de-açúcar estão a podridão vermelha e a podridão por *Fusarium*, doenças essas causadas pelos fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides*, respectivamente. Esses fungos podem se desenvolver na cana, e causar danos, ao longo de todo o seu estágio fenológico. No entanto, quando atacam os colmos da cana-de-açúcar, podem inverter a sacarose e diminuir a qualidade da matéria-prima. Esses fungos se desenvolvem no interior do colmo a partir do ataque da principal praga de dano econômico em cana, broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*), ou rachaduras de colmos (TOKESHI, 1997).

Houve a intensificação do ataque da broca e as observações de podridões em cana após a proibição da queima da matéria-prima em 2014. O emprego do fogo, na colheita manual, permitia não somente o aumento de rendimento de colheita dos colaboradores, mas também controlava a população de insetos pragas da cultura. O controle dos insetos, controlava indiretamente a ação dos fungos. Com o menor controle dos insetos, maior os danos causados por fungos (BANZATO, 2022). Como não é habitual o uso de fungicidas no controle desses microrganismos, não existe registro de fungicidas para usar em culturas de cana-de-açúcar para controlar *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*.

A partir do aumento de casos de podridão vermelha e podridão de *Fusarium*, as universidades do Brasil passaram a estudar melhor a interação planta-inseto-microrganismos para entender a resposta da planta ao ataque, como a broca seleciona a planta, como os

microrganismos se aproveitam das galerias abertas e, nesse trabalho, como os microrganismos, em co-cultivo, se relacionam.

Com esses estudos, é possível ter uma melhor perspectiva de controle com variedades resistentes, controles químicos e controles biológicos. Buscando a sustentabilidade, a indústria de produtos biológicos vem crescendo exponencialmente no Brasil buscando produtos de alta eficiência no controle de pragas e microrganismos causadores de doenças em plantas (BRASIL, 2022).

Os produtos biológicos são caracterizados como organismos biológicos ou produtos derivados desses organismos que tem uma ação benéfica. Existem produtos de origem animal, vegetal ou microbiológica que atuam contra insetos pragas e fitopatógenos minimizando danos e aumentando produtividade agrícola (NEALE, 2000).

Em cana-de-açúcar a vespa *Cotesia flavipes* é um controlador biológico da *Diatraea saccharalis*. Atualmente, as usinas ou laboratórios particulares produzem essas vespas que são liberadas no campo quando a infestação no talhão ultrapassa 3%. Esse é um exemplo de inseto que controla outro inseto. No entanto, como a *Cotesia* é liberada somente após ultrapassar 3% de infestação, os danos em alguns colmos já estão ocorrendo. *Trichogramma galloi* é outro exemplo no controle da broca. Essa vespa atua parasitando ovos de *Diatraea saccharalis*, o desafio é a liberação na fase correta dessa vespa para maximizar a eficiência do controle.

Beauveria bassiana é um fungo usado no controle da broca da cana-de-açúcar e do *Sphenophorus levis* (WENZEL et al, 2006). Esse fungo produz enzimas quitinase e proteases que degradam a cutícula dos insetos (SVEDESE, 2012). O fungo *Metarhizium anisopliae* é usado em cana no controle da cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*).

Os macrorganismos e microrganismos descritos acima que controlam pragas em cana são comercialmente produzidos e de eficiência comprovada no controle das principais pragas da cultura. No entanto, não existe registros de controles biológicos contra os fungos do complexo broca-podridão. Alternativas de controle podem ser realizadas com produtos biológicos com bactérias e/ou fungos no tratamento de colmos para produção de mudas pré-brotadas (MPBs) e formulações de compostos microbiológicos ou de plantas para aplicação no sulco de plantio.

Extratos de plantas são estudados como potencial controle biológico de doenças e alternativa aos controles químicos, conferindo sustentabilidade ao sistema de manejo nas diversas culturas agrícolas (COSTA et al., 2020). Autores estudaram a ação de extrato de alho, agave, alamanda-rosa e melão-de-são-caetano contra fungos do gênero *Fusarium* sp. e

Colletotrichum sp. e verificaram eficiência no controle dos microrganismos para as mais diversas culturas (MORAIS et al., 2010; DEMARTELAERE et al., 2021).

Se extratos de plantas tem um alto potencial em controle biológico e as folhas das plantas produzem compostos fenólicos que podemos inferir um controle sobre as doenças, então o extrato de ponteiro de cana-de-açúcar pode ter um efeito antimicrobiano sobre os fungos do complexo broca-podridão.

Sendo assim, o objetivo foi estudar a interação entre os fungos *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum* e propor um controle com extrato natural do ponteiro da cana-de-açúcar.

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar físico-quimicamente os impactos da infecção pelo complexo broca-podridão na qualidade da cana-de-açúcar;
2. Estudar a interação biológica e química entre *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum* por meio de ensaios *in vitro*;
3. Predizer compostos antifúngicos produzidos pelos fungos do complexo broca-podridão por Redes Moleculares;
4. Avaliar dois fungicidas no controle dos fungos do complexo broca-podridão;
5. Estudar a ação fungicida do extrato de ponteiro de cana-de-açúcar contra o *Fusarium verticillioides* e o *Colletotrichum falcatum in vitro*;
6. Predizer compostos antifúngicos do extrato de ponteiro de cana-de-açúcar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cana-de-açúcar

Mundialmente, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) ocupa uma área de 28 milhões de hectares com aproximadamente 2,05 bilhões de toneladas produzidas, onde o Brasil lidera o ranking de produção, seguido por Índia, Tailândia e China (FAO, 2019). No Brasil, a cana-de-açúcar é considerada a terceira cultura mais plantada, precedida da soja e do milho (IBGE, 2019).

A cana-de-açúcar é a principal matéria-prima para produção de açúcar, etanol e energia no Brasil. A área produtiva em cana-de-açúcar, na safra 2021/22, correspondeu a aproximadamente 8,317 milhões de hectares, sendo a maior representatividade dessa cultura dentro do estado de São Paulo, correspondendo a 50% da área. A produção nessa safra foi de 585,20 milhões de toneladas, redução de 10,6% em relação a safra anterior, e a produtividade média de 70,357 toneladas de cana-de-açúcar por hectare. Na safra 2021/22, 44% da produção de cana foi destinada para fabricação de açúcar, gerando 35,05 milhões de toneladas de açúcar, uma redução de 15% em relação a safra anterior, devido redução da área de plantio pela competitividade com grãos e pela baixa qualidade dos colmos por problemas climáticos com frio extremo entre junho e julho de 2021. O etanol sofreu forte redução de produção findando em 26,78 bilhões de litros, uma redução na ordem de 10% em relação a safra anterior (CONAB, 2021).

O ciclo da cana-de-açúcar no Brasil (Figura 1), de seu plantio/rebrota a colheita, corresponde um período entre 12 à 18 meses (YARABRASIL, 2016), um tempo extenso em relação a outras culturas agrícolas do país, mantendo-se exposta a uma série de fatores, como clima, pragas e doenças que podem desencadear reações de defesa, perdas de produtividade, reduções de teores de açúcares e aumento do custo de produção.

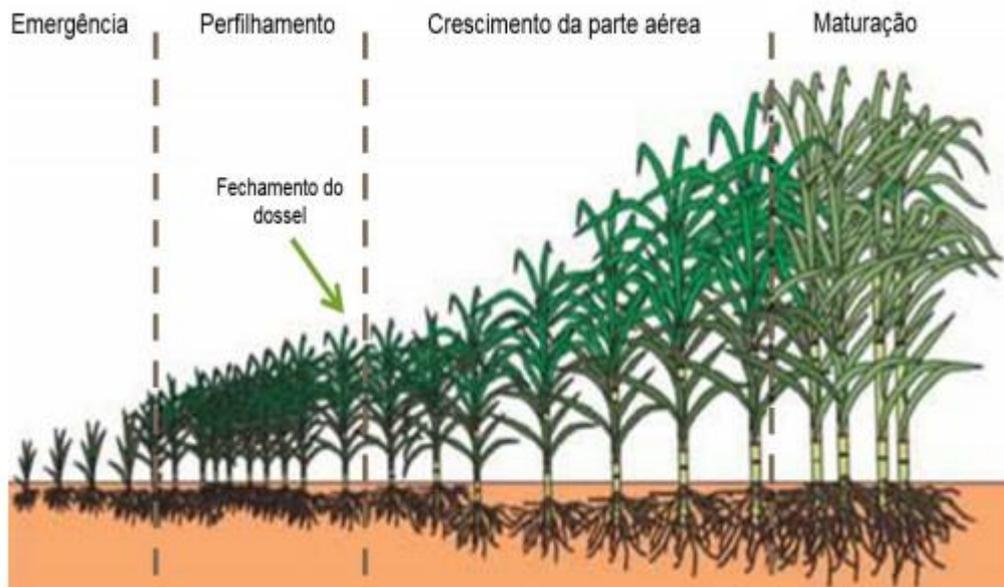


Figura 1. Ciclo vegetativo da cana-de-açúcar (YARABRASIL, 2016).

Cada fase tem sua importância do ponto de vista da produtividade. Na fase de emergência a atenção se volta as falhas de plantio e taxas de brotação, uma vez que esses dados determinam a estabilidade de canaviais e a tomada de decisões em toneladas de cana que serão produzidas por hectare, fase na qual a prática do Roguing é bastante empregada para verificação de pragas e doenças de início da fase vegetativa. O perfilamento consiste em colmos secundários que brotam da base e permitem o fechamento do dossel e o controle de plantas daninhas. A terceira fase, compreende o crescimento da parte aérea e, conseqüentemente, dos colmos. Com o surgimento dos primeiros colmos é importante o acompanhamento da principal praga da cultura, a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). A maturação da cana acontece alguns meses antes do processamento industrial e, no contexto do setor sucroenergético, é entendido como máximo acúmulo de sacarose do colmo e não a maturação fisiológica da planta com a formação de inflorescências e sementes (SANDHU et al., 2019).

Na agricultura mundial, as estimativas das perdas na produtividade provocadas por pragas e doenças correspondem a 37% da produção, dos quais 13% são causadas por insetos pragas (SILVA-FILHO; FALCO, 2000). Apesar do fenótipo robusto, a cana-de-açúcar é uma cultura de ciclo longo bastante sensível a todas as interferências do ambiente durante o período do seu cultivo, assim inúmeros são os estudos com o impacto das pragas e doenças sobre a produtividade da cana-de-açúcar (PRECETTI et al., 1988; HIGLEY, 2001; PARRA et al., 2002; PANNUTI et al., 2013).

Esse cenário, reforça a atenção com a qualidade da matéria-prima, uma vez que não somente o processo de produção, mas também os manejos empregados em campo determinarão a quantidade e a qualidade de açúcar e de etanol produzidos.

2.2. Complexo broca-podridão

Em numerosas espécies vegetais de interesse econômico as doenças têm causado grandes prejuízos na produção agrícola. Estima-se que mais de 30% da produção agrícola mundial são perdidos anualmente por problemas fitossanitários. Assim surge a necessidade de se aprimorar os conhecimentos, permitindo diminuir os danos e aumentar a produção (KIMATI et al., 2011).

Na cana-de-açúcar já foram descritas 216 doenças (causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus), das quais mais de 55 já foram relatadas no Brasil (SYNGENTA, 2020). Dentre as doenças relevantes que causam danos econômicos a essa cultura, estão a ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia* spp., o carvão, que tem como agente causal o fungo *Ustilagos citaminea* e a podridão vermelha, causada pelo fungo *Colletotrichum falcatum* (NETCHE et al., 2016).

Dentre os insetos, a praga de maior importância quanto ao dano econômico em cana-de-açúcar é a *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar), onde perdas de R\$ 4,88 bilhões em margem de contribuição agrícola e industrial são documentadas, por ano, se considerarmos a área total cultivada de cana.

Esse dano econômico pode ser maior quando, associado a broca, existe a presença de fungos, como o *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*, que se desenvolvem na parte interna do entre-nó do colmo. A presença da broca e dos fungos é o que chamamos de complexo broca-podridão.

Para cada 1% de dano nas plantas, ocorrem perdas de 3,3% em produção de açúcar e 2,9% na produção de colmos, em média, dependendo da variedade de cana-de-açúcar estudada (ALMEIDA, 2016; DINARDO-MIRANDA et al., 2013). Há relatos de perda de sacarose na ordem de 50 a 70% em colmos com a presença do complexo broca-podridão (SANTIAGO; ROSSETTO, 2018). Almeida (2016), destaca ainda que caso nenhum controle seja empregado no combate a broca da cana-de-açúcar, na região Centro-Sul do país, o prejuízo potencial seria de 12,1% na produção de cana, 3,8% na produção de açúcar e 2,7% na produção de etanol.

A presença de pragas como a broca da cana-de-açúcar reduz a qualidade da cana-de-açúcar influenciando a produtividade, os teores de açúcares, o valor da matéria-prima ao fornecedor, aumentando o número de processos industriais e o custo de produção do açúcar e etanol (DINARDO-MIRANDA, 2008; WIEDENFELD; ENCISO, 2008; VALE et al. 2011; CARVALHO et al., 2011; DINARDO-MIRANDA et al., 2010). Diâmetros e comprimentos de colmos sofrem influência, não somente da variedade, mas também das condições as quais estão expostos (SANDHU et. al., 2019).

Tamanha importância dessa praga se dá principalmente pela sua durabilidade ao longo da safra e característica do ciclo reprodutivo (Figura 2), onde o tempo de cada ciclo pode chegar a até 60 dias com 4 gerações anuais, havendo um alongamento na fase de lagarta no último ciclo. Os ovos são depositados preferencialmente na parte dorsal da folha de cana-de-açúcar e após a eclosão as lagartas se alimentam do parênquima das folhas e migram para a região da bainha. Após a primeira ecdise a lagarta perfura a parte mais mole do colmo e abre galerias horizontais e verticais, alimentando-se da parte interna, região essa de concentração de sacarose. Após 40 dias causando prejuízos internos ao colmo, a lagarta abre um orifício de saída e fecha-os com fios de seda e serragem, passando a fase de pupa com duração variando de 9 a 15 dias. A saída da mariposa do colmo se dá pelo orifício, iniciando assim um novo ciclo reprodutivo (GALLO et al., 2002).

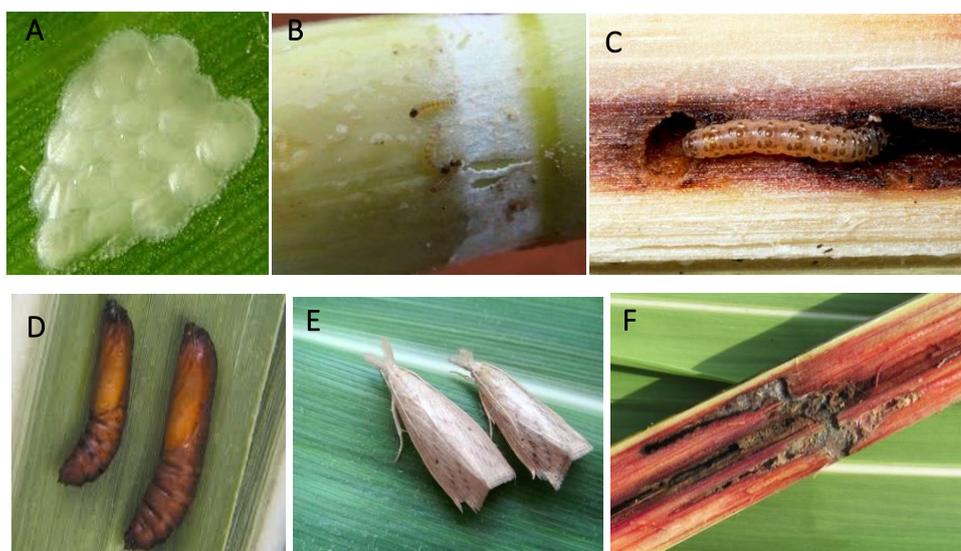


Figura 2. Ciclo reprodutivo da *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar. Nota: A. Oviposição dorsal em folhas de cana-de-açúcar, B. Lagartas de segundo instar na superfície do colmo, C. Lagarta causando danos aos entrenós de cana-de-açúcar, D. Pupa da broca da cana-de-açúcar, E. Casal adulto de *Diatraea saccharalis* e F. Danos causados ao entre-nó do colmo de cana-de-açúcar pelo complexo broca-podridão. Fonte: Agrolink, [s.d.]; ALMEIDA, 2016; PRAGAS..., 2017 e Syngenta, 2019.

As reduções dos teores de açúcares estão relacionadas ao consumo da parte interna do colmo pela lagarta da *Diatraea saccharalis* e pela inversão de sacarose em glicose e frutose pelos fungos *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum* (GALLO et al., 2002).

Esses fungos, considerados por um longo tempo como oportunistas, estão presentes no canavial e causam prejuízos internos a cana-de-açúcar quando aberturas são realizadas na planta, seja por rompimento da parede celular abióticamente ou pela ação da broca da cana-de-açúcar. O *Colletotrichum falcatum* e o *Fusarium verticillioides*, encontram um ambiente interno ideal de desenvolvimento, com proteção e substrato, e invertem a sacarose do colmo, reduzindo a quantidade de açúcar industrializável (ARRUDA et al., 2014).

2.3. Fungos causadores de podridão em cana-de-açúcar

Os fungos, *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum* apresentam parede celular composta por glucana e quitina, são organismos eucariotos, filamentosos, pertencentes ao filo Ascomycota, parasitas facultativos e ocorrem nas formas anamórfica e teleomórfica (HIBBETT et al., 2007; MAIA; CARVALHO-JUNIOR, 2010).

No ano de 2012, os fungos do gênero *Colletotrichum* foram classificados como o oitavo grupo mais importante de fungos fitopatogênicos no mundo, baseado em perspectivas científicas e significância econômica (DEAN et al., 2012). O gênero *Fusarium* está entre os maiores causadores de doenças de plantas no Brasil e tem extrema importância uma vez que produzem toxinas como tricotecenos, fumonisinas, zearalenona, moniliformina e ácido fusárico (TINOCO, 2010).

No setor sucroenergético, desde 2014 se intensificou a atenção aos fungos *Colletotrichum falcatum*, causador da doença conhecida como podridão vermelha, e o *Fusarium verticillioides*, causador da doença podridão por *Fusarium*, devido as leis de proibição no emprego da queima da cana-de-açúcar em áreas de colheitas manuais passíveis de mecanização (BRASIL, 2002). Apesar dos impactos negativos da queima como, emissão de gases de efeito estufa, degradação da matéria orgânica, queima da palhada, existia os lados benéficos como aumento de rendimento de corte pelo colaborador, e melhor controle de pragas e doenças diminuindo os prejuízos ao longo das safras.

O *Colletotrichum falcatum* Went, infecta a cana-de-açúcar em 68 países causando reduções de produção de 5 a 50% e recuperações de açúcar menores do que 31% (BHARTI et al., 2012; GHAZANFAR; KARAN, 2016). Além disso, seus danos vão além da perda de

produção, reduzindo a qualidade do caldo de cana-de-açúcar, com a redução da concentração de sacarose, da pureza e dos açúcares redutores (THANGAMANIL et al., 2013). A podridão vermelha é considerada uma das principais doenças em cana no mundo, devido seus efeitos destrutivos (MALATHI et al., 2002). O manejo dessa doença em campo é difícil uma vez que a composição genética desse fungo está sempre mudando (PATEL et al., 2019).

No campo, o fungo *Colletotrichum falcatum* infecta as folhas e a parte interna do colmo da cana (Figura 3). Os conídeos ficam na palhada da cana e as novas plantas, a cada brotação ou rebrota, entram em contato com essas estruturas fúngicas. Os danos foliares são estrias vermelhas na nervura central, reduzindo a área foliar sadia, a capacidade fotossintética, diminuindo o acúmulo de sacarose no colmo e reduzindo consequentemente a tonelada de cana por hectare. Já nos colmos penetra por galerias causadas por pragas, como a *Diatraea saccharalis*, ou rachaduras. Ao longo do desenvolvimento do fungo, ocorre a inversão da sacarose em glicose e frutose e outros compostos são produzidos diminuindo a qualidade do caldo.



Figura 3. Ciclo de vida do *Colletotrichum falcatum* Went em cana-de-açúcar (JULIATTI et al., 2020).

Atualmente, o controle da podridão vermelha se dá pelo plantio de variedades resistentes, liberação de controladores biológicos e aplicação de inseticidas e fungicidas. As variedades resistentes não representam alta eficiência no controle, uma vez que a mudança genética desse microrganismo é alta e sua morfologia muda dependendo de sua origem geográfica (MALATHI et al., 2019; VISWANATHAN et al., 2019; HOSSAIN et al., 2020). O controle biológico indireto se dá com a liberação de *Cotesia flavipes* e *Trichogramma*

galloi, por exemplo, no controle da broca da cana-de-açúcar, causando uma minimização dos danos pelo *Colletotrichum falcatum* uma vez que reduz a oportunidade do fungo em entrar em contato com a parte interna do colmo. Já o controle biológico direto acontece através de rizobactérias e *Trichodermas*, por exemplo (YADAV et al., 2008; SHIVAS; TAN, 2009; HASSAN et al., 2012; BHARDWAJ et al., 2017; KATIYAR et al., 2017).

O emprego de fungicidas para controle de *Colletotrichum falcatum*, em áreas de cana-de-açúcar, não é uma rotina, apesar de existir três fungicidas registrados para a cultura. Fungicidas aplicados em canaviais estão, na maioria das vezes, relacionados ao controle de ferrugens (SUBHANI et al., 2008; BHARADWAJ; SAHU, 2014). No entanto, o uso de fungicida deve ser estudado como forma de minimizar a ação desse fungo, reduzindo assim as perdas nos teores de açúcares. Alternativas biológicas também devem ser incentivadas, focando em um menor impacto ambiental.

O *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, assim como o *Colletotrichum falcatum*, é um fungo de solo (Figura 4), com capacidade de sobrevivência por um longo período no campo pela presença dos clamidósporos podendo infectar diferentes partes das plantas com seus conídeos (DAVIS et al., 2006).

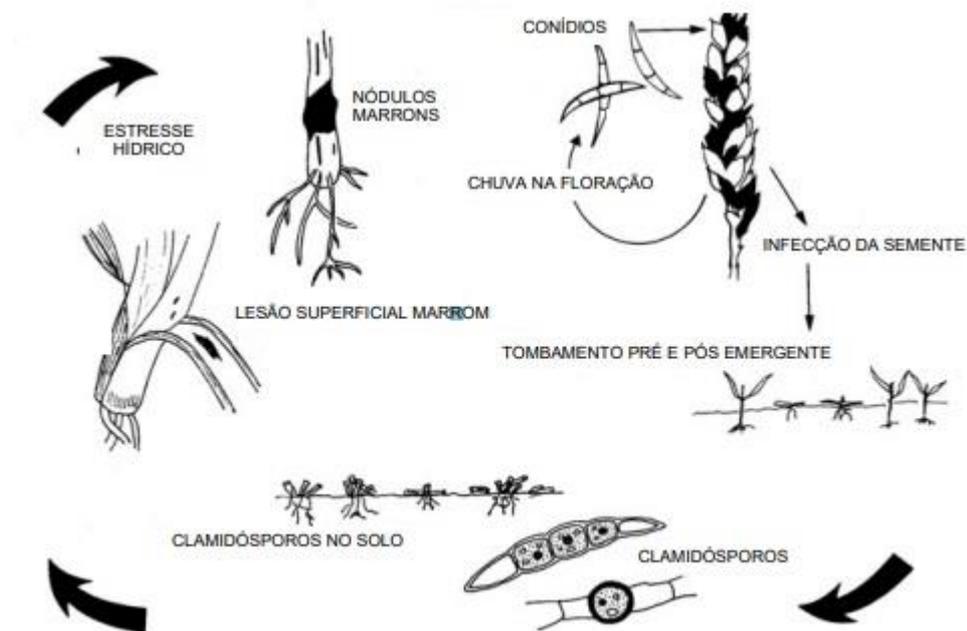


Figura 4. Ciclo de vida do *Fusarium verticillioides* (Adaptado de PARRY, 1990).

Esse fungo apresenta uma colonização endofítica e se espalha pelo colmo interno da planta, atingindo também as folhas. Canaviais infestados por esse fungo podem apresentar

perdas de produção variando de 5 a 20% e de açúcares redutores na ordem de 4 a 27,8% (WHITTLE; IRAWAN, 2000; WANG et al., 2017).

A podridão por *Fusarium* é a doença causada pelo *Fusarium verticillioides* e é propagado pelo ar, água de irrigação e equipamentos ou maquinários contaminados. Recentes estudos mostraram uma propagação vertical desse fungo pela *Diatraea saccharalis* aos seus descendentes (FRANCO et al., 2021). Com isso, o oportunismo do *Fusarium verticillioides* passa a ser questionado e os estudos do complexo broca-podridão em cana-de-açúcar e da Fusariose em milho se intensificam na área da microbiologia agrícola.

Os sintomas da podridão por *Fusarium* são observados nas folhas infectadas que se apresentam enroladas, distorcidas, mal formadas e cloróticas (MARTIN et al., 1961; WHITTLE; IRAWAN, 2000). A doença vem ganhando atenção dos produtores nos últimos anos e os métodos de controle utilizados são os mesmos aplicados ao *Colletotrichum falcatum*, exceto fungicidas, pois não existe nenhum registro desses produtos contra o *Fusarium verticillioides* para a cana-de-açúcar.

As lavouras de cana são a segunda no uso de defensivos agrícolas no país, ficando atrás apenas da soja. Na cultura, ênfase tem sido dado ao melhoramento genético de clones e variedades superiores e não existe a tradição ou o costume de se utilizar fungicidas foliares ou no tratamento da soqueira no pós-corte durante a brotação, atividade que pode garantir a produtividade.

O manejo integrado de doenças (MID) é uma ferramenta importante para manejo das principais doenças que ocorrem na cultura, incluindo a tomada de decisão para uso de fungicidas, seja sintético ou natural, no momento correto e na dose/resposta adequada para cada situação ou variedade cultivada (JULIATTI et al., 2020).

A proposta de métodos alternativos de controle de doenças de plantas são um foco na atualidade, buscando a diminuição no uso de produtos fitossanitários sintéticos, priorizando o meio ambiente e diminuição dos custos de produção (OLIVEIRA et al., 2014). Para facilitar a tomada de decisão de manejo em campo é importante entender a interação entre os fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides*.

2.4. Produtos naturais no controle de doenças de plantas

Mundialmente, a biodiversidade permite a prospecção de compostos com atividades biológicas, oriundos principalmente de plantas, microrganismos e outros organismos como os marinhos, por exemplo (PINTO et al., 2002).

Compostos produzidos por microrganismos, plantas e animais têm sido cada vez mais utilizadas como bioinseticidas, bioherbicidas e antimicrobianos como aliados na alternativa para substituir pesticidas sintéticos, diminuindo a incidência da resistência de fungos fitopatogênicos e toxicidade para o ambiente (LI et al., 2016a).

Na última década vem aumentando os registros no Ministério da Agricultura de novos bioprodutos capazes de controlar pragas e doenças. Um levantamento de 2020 mostrou que dentre as substâncias químicas naturais 8% dos registros de produtos são de semioquímicos (feromônios e aleloquímicos) e 7% são bioquímicos (hormônios reguladores de crescimento e enzimas). Já os agentes biológicos de controle abrangem os microbiológicos com 65,4% dos registros e macrobiológicos com 19,6% (MAPA, 2020).

Os compostos naturais originários de plantas estão sendo fortemente estudados, principalmente no controle de pragas e doenças na agricultura. Fenólicos são produzidos pelas plantas como mecanismos estruturais ou bioquímicos para impedir ou retardar interações maléficas com microrganismos (MURRIA et al. 2018; PASCHOLATI; DALIO, 2018). Plantas ou folhas jovens não apresentam estruturas de defesa estabelecidas, e lançam mão da síntese de metabólitos especializados para sua defesa e proteção (WIGGINS et al. 2016).

Esses compostos são geralmente metabólitos especializados, produzidos no final do processo fermentativo, apresentam baixa massa molecular e complexa estrutura química. (TAKAHASHI; LUCAS, 2008; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Diferentes rotas de produção de compostos fenólicos e flavonóides estão ativas na planta. Rotas metabólicas de pré-formação, evitam o ataque de uma praga ou o desenvolvimento de uma doença. Contudo, as rotas de pós-formação são as responsáveis pela defesa da planta quando o ataque da praga ou o desenvolvimento dos microrganismos já aconteceu, minimizando as consequências ou perpetuando a espécie (WALLER, 1999; MANOHAR et al., 2014).

Extratos de plantas contendo fenólicos e flavonóides estão sendo empregado em estudos com a finalidade de medir a ação fungicida ou fungistática contra os principais fungos que atacam a agricultura brasileira.

O surgimento de novos produtos comerciais naturais torna-se fundamentais na produção de cana-de-açúcar no Brasil. Extratos de plantas tem um alto potencial de atividade biológica contra uma série de pragas e microrganismos. A Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA), apresentou resultados de extratos de *Clerodendrum splendens*, *Conyza canadensis*, *Tithonia diversifolia* e *Vernonanthura westiniana* contra a

lagarta da *Anticarsia gemmatalis*, praga de soja, onde as ações inseticidas apresentaram índices de 80% na mortalidade no inseto (EMBRAPA, 2019).

Estudos de extratos de alho e capim-santo são empregados no controle de *Fusarium proliferatum*, assim como extratos de melão-de-são-caetano tem ação antimicrobiana contra *Colletotricum musae* (SOUZA et al., 2007; CELOTO et al., 2011). Sendo assim, muitas empresas de prospecção de produtos naturais têm aberto caminhos para o controle de pragas e doenças na agricultura.

Na cultura de cana-de-açúcar uma enorme quantidade de ponteiro é deixada em campo após a colheita. Dessa forma, podemos explorar esse material como fonte de metabólitos especializados, principalmente fenólicos e flavonóides, no controle de doenças da própria cultura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material

Feixes contendo 10 colmos de cana-de-açúcar da variedade RB867515 sadias e infectadas pelo complexo broca-podridão em seu estágio de máximo acúmulo de sacarose, foram coletadas, em triplicata, na região de Piracicaba.

Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), acetato de etila PA, metanol PA, hidróxido de sódio PA, ácido clorídrico PA, subacetato de chumbo PA, carbonato de sódio PA, ácido tânico PA, papel filtro nº 1, placas de Petri 90 x 15 mm e placas de Petri 60 x 15 mm, foram adquiridos comercialmente.

Os fitopatógenos de cana, *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Marcio de Castro Silva Filho, do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, do Departamento de Genética, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

3.2. Métodos

3.2.1. Altura e diâmetro de colmos de cana-de-açúcar

Todos os colmos dos feixes foram medidos com trena. Para altura de colmo a medição ocorreu do entre-nó mais próximo ao solo até o entre-nó mais maduro abaixo do ponteiro, e o resultados obtidos em metros. Já para diâmetro de colmos a medição ocorreu com uso do paquímetro no entre-nó mediano do colmo, e os resultados foram expressos em centímetros.

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

Os feixes de cana foram preparados segundo Norma ABNT NBR 16226, onde os colmos, de cada tratamento, foram separadamente desfibrado em moinho do tipo forrageiro. Para extração do caldo e caracterização, foram realizadas três pesagens de 500 g de cana-de-açúcar desfibrada e o material foi submetido a prensa hidráulica nas condições de 250 kgf cm⁻² de pressão por um minuto, objetivando a retirada do caldo (ABNT NBR 16221). O bolo úmido (material resultante da prensagem) foi pesado para determinação do teor de fibra e o caldo filtrado em algodão.

As análises tecnológicas de determinação de qualidade de matéria-prima, foram realizadas segundo o (CONSECANA, 2015). A seguir, os métodos empregados e os cálculos para determinação dos parâmetros tecnológicos:

3.2.2.1. Fibra%cana (F)

De acordo com a Norma ABNT NBR 16251, o peso do bolo úmido em balança semi-analítica foi disposto segundo Equação 1

$$F = 0,08 \times \text{PBU} + 0,876 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,

PBU: Peso do bolo úmido (g)

3.2.2.2. Brix%caldo (porcentagem em massa de sólidos solúveis)

A medição foi realizada em refratômetro Bellingham + Stanley Ltd., modelo RFM 712 refratometer com correção automática de temperatura a 20 °C, segundo ANBT NBR 16223. O princípio de funcionamento está no índice de refração de substâncias entre dois meios.

3.2.2.3. Pol%caldo (porcentagem em massa de sacarose aparente)

A leitura foi realizada em polarímetro modelo ADS 420 saccharimeter, Bellingham + Stanley Ltd., conforme ABNT NBR 16224 e 16271. Um volume de 100 mL de caldo foi adicionado a 6 g de subacetado de chumbo PA e homogeneizado. Após filtração em papel filtro qualitativo o filtrado foi adicionado a cubeta para leitura de Pol no polarímetro. A leitura foi dada em °Z, o ângulo desviado da luz polarizada, e a Pol%caldo calculada segundo Equação 2.

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

3.2.2.4. Pureza (Q)

Realizada de acordo com a Norma ABNT NBR 16271 a partir da Equação 3 e expressa em porcentagem.

$$Q = (\text{Pol\%caldo} / \text{Brix\%caldo}) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

3.2.2.5. Pol%cana (PC)

Calculada segundo a Norma ABNT NBR 16271 utilizando a Equação 4.

$$\text{PC} = \text{Pol\%caldo} \times (1 - 0,01 \times F) \times C \quad (\text{Equação 4})$$

Onde,

F = Fibra%cana;

C = Coeficiente utilizado para transformação da pol do caldo, extraído pela prensa, em pol da cana, segundo a equação 5.

$$C = 1,0313 - 0,00575 \times F \quad (\text{Equação 5})$$

3.2.2.6. AR%caldo (açúcares redutores do caldo)

Cálculo realizado segundo Norma ABNT NBR 16252, conforme Equação 6.

$$\text{AR\%caldo} = 3,641 - 0,0343 \times Q \quad (\text{Equação 6})$$

Onde,

Q: Pureza aparente do caldo em porcentagem.

3.2.2.7. ARC% (açúcares redutores da cana)

Conforme Norma ABNT NBR 16271 onde o cálculo está disposto na Equação 7.

$$\text{ARC} = \text{AR\%caldo} \times (1 - 0,01 \times F) \times C \quad (\text{Equação 7})$$

Onde,

F: Fibra%cana;

C: Coeficiente.

3.2.2.8. ATR (Açúcar total recuperado)

Conhecendo-se a Pol%cana e o ARC, o ATR foi calculado pela Equação 8, segundo a Norma ABNT NBR 16271.

$$\text{ATR} = 10 \times \text{PC} \times 1,05263 \times 0,915 + 10 \times \text{ARC} \times 0,915 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde,

10 x PC: Pol por tonelada de cana;

1,05263: Coeficiente estequiométrico para a conversão da sacarose em açúcares redutores;

0,915: Coeficiente de recuperação, para uma perda industrial de 8,5%;

10 x ARC: Açúcares redutores por tonelada de cana.

3.2.3. Preparo dos meios

Os meios de cultura escolhidos foram BDA e caldo de cana-de-açúcar. O meio BDA é o meio comumente utilizado para crescimento de fungos e o meio caldo de cana-de-açúcar

foi escolhido para simular o ambiente que os fitopatógenos se desenvolvem na cultura da cana.

Para o ensaio com meio BDA, foram pesados em balança semi-analítica, 39 g de meio comercial batata-dextrose-ágar (BDA) para cada litro de água destilada. Foram realizadas medições de pH, e ajustado a pH de 5,6.

O preparo do meio de caldo de cana-de-açúcar foi realizado a partir do caldo extraído na prensagem. Esse caldo foi peneirado e adicionado ágar na concentração 25 g L⁻¹. O pH foi ajustado para 5,6, conforme as condições do meio BDA e, também, para proporcionar o endurecimento do ágar. As medições ocorreram em pHmetro de bancada Spencer Scientific modelo SP3611 e os ajustes, quando necessário, foram realizados com soluções de NaOH 0,05 mol L⁻¹ ou HCl 0,05 mol L⁻¹.

Os meios foram agitados manualmente, para maximizar a dissolução, e submetidos a autoclave a 121°C, 1 atm por 20 min. Após parcial resfriamento, 15 mL dos meios foram distribuídos nas placas de Petri 90 x 15 mm, para ensaios biológicos de interação entre os fungos, ou 10 mL nas placas de Petri 60 x 15 mm, para os ensaios biológicos de incorporação de fungicidas e extratos foliares.

Anteriormente a manipulação dos microrganismos e incubação, o fluxo laminar e a *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) foram desinfetados com Lisorforme e em seguida com álcool 70%. O fluxo laminar ainda foi submetido a 15 minutos de luz UV para minimizar a ocorrência de contaminação.

3.2.4. Ensaio biológico por cultivo pareado

Para analisar as interações entre os fungos *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*, realizamos o ensaio de cultivo pareado.

Com o auxílio de um furador com 1 cm de diâmetro, os microrganismos foram transferidos da parte periférica de uma placa de repique, intencionalmente coletando as hifas mais novas, para as placas de Petri 90 x 15 mm, contendo os meios preparados para o ensaio de cultivo pareado.

Os microrganismos foram inoculados em modo axênico com plugs descentralizados, para que os resultados pudessem ser comparados com as placas contendo os ensaios em co-cultivo, onde os microrganismos ficaram igualmente distanciados das extremidades das placas e do plug do outro microrganismo.

Os microrganismos foram incubados em BOD a 30°C, durante 10 dias na ausência de luz. Após esse período fotografias foram tiradas das placas de Petri e as medições de área de colônia foram realizadas através do software online Image J.

3.2.5. Ensaio de cultivo biológico com incorporação de extrato microbiológico aos meios de cultura

Os meios de cultura BDA e caldo de cana-de-açúcar foram preparados da mesma forma que descrito no item 3.3. Já, os extratos, foram preparados a partir da massa seca descrita no item 3.6.1.

As massas secas de extrato de *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum falcatum* e do co-cultivo foram ressuspensos em 5 mL de metanol e os extratos foram adicionados aos meios de cultura, previamente resfriados, na concentração de 500 µg mL⁻¹.

Usando o método “Poisoned Food Technique” (NENE; THAPLIYAL, 1982), em placas de Petri de 60 x 15 mm foram vertidos os meios de cultura contendo os extratos. Após solidificação dos meios, o *Fusarium verticillioides* foi inoculado em placas contendo: Meios BDA + metanol; Meio BDA + extrato de *Colletotrichum falcatum*; Meio de caldo de cana-de-açúcar + metanol e Meio de caldo de cana-de-açúcar + extrato de *Colletotrichum falcatum*, em triplicata. Já o *Colletotrichum falcatum* foi inoculado em placas contendo: Meios BDA + metanol; Meio BDA + extrato de *Fusarium verticillioides*; Meio de caldo de cana-de-açúcar + metanol e Meio de caldo de cana-de-açúcar + extrato de *Fusarium verticillioides*, em triplicata. As placas foram incubadas em BOD a 30°C, por 6 dias na ausência de luz.

A avaliação foi realizada a partir de registro fotográfico após 6 dias de incubação e as imagens foram inseridas no software online Image J para cálculo de área.

3.2.6. Estudo químico de compostos especializados de extratos fúngicos

3.2.6.1. Obtenção de extratos fúngicos

Plugs foram retirados após 10 dias de inoculação das placas de Petri do ensaio em fase sólida e acondicionados em béquer de vidro. Os plugs foram retirados das regiões mais novas do micélio (extremidade da colônia) das placas contendo inoculações em modo axênico. Também foram retirados plugs de placas que continham somente meio de cultura. As extrações foram realizadas em um ultrassom por 15 minutos por amostra, utilizando 40 mL da mistura de solventes de acetato de etila:metanol:água ultrapura Milliq (80:10:10) para cada 600 mg de material fresco. Em seguida, as amostras foram filtradas com lã de vidro, secas sob

vácuo em rotaevaporador a 35°C, e posteriormente submetidas a secagem total em concentrador a vácuo modelo RVT5105 (Thermo Scientific, São Paulo, Brasil) obtendo a massa seca. Com a finalidade de retirar interferentes do meio presentes nesses extratos, ou seja, açúcares, as amostras foram ressuspensas em 0,5 mL de água ultrapura e 0,5 mL de metanol e eluídas em uma coluna Discovery® DSC-18 SPE de 2 g, previamente condicionada (30 mL de metanol seguido de 30 mL de uma solução metanol:água ultrapura 1:1 e 30 mL de água ultrapura). Após o condicionamento, o extrato foi adicionado a coluna e 30 mL de água ultrapura foram adicionados, para retirada dos interferentes. Para remoção dos compostos microbianos, e recolhimento das frações, as amostras foram eluídas com 30 mL de uma solução metanol:água 1:1 seguida de 30 mL de metanol. Em seguida, as amostras foram submetidas a secagem total utilizando o concentrador a vácuo. Aproximadamente 1 mg das amostras foram enviadas para realização de cromatografia líquida de ultra eficiência e espectrometria de massas in tandem - UPLC-MS/MS, em parceria com o Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP).

3.2.6.2. Análises em UPLC-qTOF-MS/MS

Os extratos fúngicos secos, foram ressuspensos em metanol a uma concentração de 1 mg mL⁻¹ e 10 µL foi injetado no cromatógrafo Acquity UPLC H Class equipment - Xevo G2-XS Qtof (Waters). A fase estacionária usada foi a coluna C18 Acquity UPLC BEH (1,7 µm, 2,1 x 100 mm) e a fase móvel foi em gradiente de eluição de 10 a 100% de acetonitrila (ACN) + 0,1% ácido fórmico (AF) in H₂O + 0,1% AF (por 12 min), seguido de eluição isocrática 100% ACN + 0,1% AF (por 3 min), e fase de re-equilíbrio de 5% ACN + 0,1% AF (3 min), com fluxo de 400 µL min⁻¹. Os dados foram adquiridos em MS1 com varredura m/z 100 – 1500, com tempo de escaneamento de 150 ms em modo “data dependent acquisition” (DDA), e até cinco varreduras MS2 em modo CID foram adquiridas por ciclo (onde os cinco íons mais abundantes em MS1 foram selecionados) com tempo de escaneamento de 100 ms. A pesquisa MS foi configurada para mudar a aquisição MS2 quando o TIC subiu, e a aquisição MS2 voltou para o levantamento MS após decorridos 0,25 segundos. A energia de ionização foi de 1,2 Kv, os valores de m/z foram gravados em modo centróide e as detecções foram realizadas em modo positivo.

3.2.6.3. Processamento dos dados e análises estatísticas

Os arquivos de dados de MS2 foram convertidos para o formato .mzXML usando o software MSConvert (CHAMBERS et al., 2012) e processado com o MZmine 2 (version

2.53) (PLUSKAL et al., 2010). A detecção da massa foi realizada mantendo o nível de ruído de 1,0E4 para MS1 e 1,0E2 para MS2. A construção dos cromatogramas foram realizadas com um intervalo de tempo mínimo de 0,01 min, altura mínima de 1,0E4 e tolerância m/z de 20 ppm. O algoritmo de deconvolução do cromatograma usado foi o ‘baseline cut-off’, com altura mínima do pico de 1,0E4, nível de linha de base de 1,0E3 e intervalo de duração do pico de 0,01 – 1 min. As varreduras de MS2 foram pareadas usando uma faixa de tolerância m/z de 0,5 Da e faixa de tolerância do tempo de retenção (TR) de 0,1 min. Os parâmetros do algoritmo de alinhamento dos picos isotópicos foram: tolerância m/z de 20 ppm, tolerância TR de 0,1 min, carga máxima de 2 e o pico mais intenso foi escolhido para representar todo o padrão isotópico. Depois dessa etapa, os arquivos .mgf para cada .mzXML original foram exportados para aprofundar a análise de rede. O alinhamento do pico foi realizado usando o módulo ‘join aligner’ (tolerância m/z : 20 ppm, peso para m/z : 75%, tolerância TR: 0,3 e peso para TR: 25%). A lista de picos foi filtrada para manter apenas os recursos de íons com dados MS2, um mínimo de dois picos seguidos e dois picos em mesmo padrão de isótopos. Picos duplicados também foram filtrados com uma varredura de 0,2 min de tolerância de TR, criando um consenso para duplicatas. Os dados foram preenchidos com uma tolerância de intensidade de 0,1%, 10 ppm de tolerância de massa e 0,05 min de tolerância de TR, e as áreas de pico foram normalizadas pela intensidade média. Picos abundantes observados no branco foram excluídos manualmente. Então, a tabela de quantificação .csv foi exportada usando módulo ‘Export to Metaboanalyst’ para mais análises estatísticas no website Metaboanalyst 5.0 (CHONG et al., 2018). O conjunto de dados foi submetido a transformação de log, para facilitar visualização dos dados, e submetidos a análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Os modelos foram validados internamente por validação cruzada completa.

3.2.6.4. Perfil de metabólitos

A Rede Molecular ou Molecular Networking, em inglês, foi criada usando um fluxo de trabalho online do website GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>) com arquivos .mgf exportados do MZmine2 (WANG et al., 2016). Os dados foram filtrados removendo todos os íons fragmentados MS/MS de +/- 17 Da do precursor m/z . Espectros MS/MS foram filtrados por janela escolhendo apenas os seis principais íons de fragmento na janela de +/- 50 Da em todo o espectro. A tolerância da massa do íon precursor foi definida para 0,02 Da e a tolerância do íon fragmentado MS/MS para 0,02 Da. Uma rede foi então criada onde as arestas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,75 e mais de oito picos

correspondentes. Além disso, as arestas entre os dois nós foram mantidas na rede se, e somente se, cada um dos nós aparecesse nos respectivos dez nós mais semelhantes. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100 e as bordas de pontuação mais baixa foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados contra as bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros de rede e espectros de biblioteca precisavam ter uma pontuação acima de 0,75 e pelo menos sete picos correspondentes. A rede molecular foi visualizada usando o software Cytoscape (SHANNON et al., 2003) onde o diagrama de Venn foi construído usando o modo 'Venn and Euler Diagrams'. O trabalho de rede molecular pode ser acessado publicamente em <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=a3c1140a3e2d4a159b0e7109e292a82a>.

Para melhorar a anotação espectral, a rede molecular foi submetida ao fluxo de trabalho da Propagação de Anotação de Rede (NAP) (DA SILVA et al., 2018) onde as 10 primeiras estruturas candidatas dos nós vizinhos e os resultados da reclassificação do Fusion foram usados para reclassificação de consenso. Os candidatos foram pesquisados dentro de uma janela de 20 ppm no GNPS, Natural Products Atlas (SANTEN et al., 2019) e na base de dados Super Natural II (BANERJEE et al., 2015). Os adutos $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$ eram esperados para a massa do íon precursor. A classificação composta foi acessada com a ferramenta ClassyFire (DJOUMBOU FEUNANG et al., 2016). Anotações *In silico* pelo NAP e DEREPLICATOR (MOHIMANI et al., 2017) foram integradas dentro da Rede Molecular para anotar classes químicas para os recursos MN usando a ferramenta MolNetEnhancer (ERNST et al., 2019). Também foi usada a ferramenta SIRIUS + CSI:FingerID (BÖCKER; DÜHRKOP, 2016; DÜHRKOP et al., 2019) para anotação de fórmula molecular e pesquisa *in silico* de espectro único com tolerância m/z definida para 20 ppm.

3.2.7. Preparo do extrato foliar de ponteiro de cana-de-açúcar

Os ponteiros de cana-de-açúcar da variedade RB867515 sadias foram preparados segundo Colombo e colaboradores (2006), com modificações na extração primária de compostos do ponteiro. Em laboratório os ponteiros foram picados, acondicionados em sacos de papel e secos em estufa de circulação de ar forçada até peso constante. Após secagem, os ponteiros foram moídos em moinho de bancada tipo Willey e o material vegetal recolhido com 1 mm de tamanho do particulado.

Para a extração 10 g do ponteiro de cana-de-açúcar seco e moído foi pesado em béquer de vidro e em seguida adicionado 200 mL de uma solução metanol:água ultrapura 1:1. Esse material foi submetido a ultrassom por 10 minutos e posteriormente a uma agitação magnética por 2 h. Após a agitação, 10 g de Celite foi adicionado e a solução submetida a filtração a vácuo para separar os particulados do extrato. O extrato filtrado passou por uma rotaevaporação (IKA RV 10 DIGITAL) à 35°C até que o volume diminuísse a um volume de 5 mL para que a secagem finalizasse em concentrador a vácuo modelo RVT5105 (Thermo Scientific, São Paulo, Brasil). A massa desse material seco foi determinada, através da subtração do valor do frasco.

Os extratos brutos secos foram ressuspensos em 3 mL de uma solução metanol:água 1:1 e submetidos a uma purificação em cartucho C18 de 60 mg e 30 µm de partícula. Esse cartucho foi pré-condicionado com 30 mL de metanol, seguido de 10 mL de uma solução de metanol:água 1:1 e 30 mL de água ultrapura. Os extratos ressuspensos foram adicionados a coluna e eluídos com 30 mL de água ultrapura, fração descartada, seguindo de 30 mL de uma solução metanol:água 1:1 (resultando no Extr. MeOH Água) e findando em 30 mL de metanol gerando o extrato metanólico.

As frações foram secas em concentrador a vácuo, as massas foram pesadas e ressuspensas em 5 mL de metanol:água ou metanol, dependendo da fração, para incorporação em meio de cultura para testes de inibição do extrato.

3.2.8. Ensaio biológico de incorporação de fungicidas e extratos brutos de ponteiro de cana-de-açúcar em meios de cultura

Os meios de cultura BDA e caldo de cana-de-açúcar foram preparados conforme descrito no item 3.3. Já, os extratos, foram preparados a partir da massa seca descrita no item 3.7. O método utilizado para incorporar os extratos e os fungicidas foi o “Poisoned Food Technique” (NENE; THAPLIYAL, 1982).

As frações de massas secas dos extratos de ponteiro metanólicos foram ressuspensas em 5 mL de metanol, enquanto as frações secas de extrato de ponteiro metanol:água foram ressuspensas em 5 mL de uma solução metanol:água. A concentração adicionada ao meio de cultura, previamente resfriado, foi de 500 µg mL⁻¹.

Os fungicidas comerciais utilizados foram o Fox, da empresa BAYER, e o Muneo, da empresa BASF. A concentração utilizada na incorporação em meio de cultura foi de 10 µg mL⁻¹, uma vez que essa dosagem, após testes em meio BDA, apresentou controle dos fungos do complexo broca-podridão.

Em placas de Petri de 60 x 15 mm foram vertidos os meios de cultura contendo os extratos. Após solidificação dos meios, o *Fusarium verticillioides* e o *Colletotrichum falcatum* foram inoculados, em modo axênico e co-cultivo em placas contendo: Meios BDA + metanol (controle); Meio BDA + extr. MeOH Água; Meio BDA + extr. MeOH; Meio BDA + fungicida Fox; Meio BDA + fungicida Muneo; Meio de caldo de cana-de-açúcar + metanol (controle), Meio de caldo de cana-de-açúcar + extr. MeOH Água; Meio caldo de cana-de-açúcar + extr. MeOH, Meio caldo de cana-de-açúcar + fungicida Fox; Meio caldo de cana-de-açúcar + fungicida Muneo; em triplicata. As placas foram incubadas em BOD a 30°C, por 6 dias na ausência de luz.

A avaliação foi realizada a partir de registro fotográfico após 6 dias de incubação e as imagens foram inseridas no software online Image J para cálculo de área.

3.2.9. Estudo químico de compostos especializados de extratos de ponteiro de cana-de-açúcar.

Os extratos secos de ponteiro de cana-de-açúcar, foram ressuspensos a uma concentração de 1 mg mL⁻¹ em metanol:água ou metanol conforme o tratamento. As análises cromatográficas, as detecções no espectrômetro de massas e as estatísticas dos resultados foram as mesmas realizadas para os extratos microbiológicos descritas em 3.6.2, 3.6.3 e 3.6.4, com algumas modificações.

3.2.9.1. Análises em UPLC-qTOF-MS/MS

Os extratos secos de ponteiro de cana-de-açúcar, foram ressuspensos em metanol:água 1:1 ou metanol 100% a uma concentração de 1 mg mL⁻¹ e 10 µL foi injetado no cromatógrafo Acquity UPLC H Class equipment - Xevo G2-XS Qtof (Waters). A fase estacionária usada foi a coluna C18 Acquity UPLC BEH (1,7 µm, 2,1 x 100 mm) e a fase móvel foi em gradiente de eluição de 10 a 100% de acetonitrila (ACN) + 0,1% ácido fórmico (AF) in H₂O + 0,1% AF (por 12 min), seguido de eluição isocrática 100% ACN + 0,1% AF (por 3 min), e fase de re-equilíbrio de 5% ACN + 0,1% AF (3 min), com fluxo de 400 µL min⁻¹. Os dados foram adquiridos em MS1 com varredura m/z 100 – 1500, com tempo de escaneamento de 150 ms em modo “data dependent acquisition” (DDA), e até cinco varreduras MS2 em modo CID foram adquiridas por ciclo (onde os cinco íons mais abundantes em MS1 foram selecionados) com tempo de escaneamento de 100 ms. A pesquisa MS foi configurada para mudar a aquisição MS2 quando o TIC subiu, e a aquisição MS2 voltou para o levantamento MS após decorridos 0,25 segundos. A energia de ionização foi de

1,2 Kv, os valores de m/z foram gravados em modo centróide e as detecções foram performadas em modo positivo.

3.2.9.2. Processamento dos dados e análises estatísticas

Os arquivos de dados de MS2 foram convertidos para o formato .mzXML usando o software MSConvert (CHAMBERS et al., 2012) e processado com o MZmine 2 (version 2.53) (PLUSKAL et al., 2010). A detecção da massa foi realizada mantendo o nível de ruído de $1,0E4$ para MS1 e $1,0E2$ para MS2. A construção dos cromatogramas foram realizadas com um intervalo de tempo mínimo de 0,01 min, altura mínima de $1,0E4$ e tolerância m/z de 20 ppm. O algoritmo de deconvolução do cromatograma usado foi o ‘baseline cut-off’, com altura mínima do pico de $1,0E4$, nível de linha de base de $1,0E3$ e intervalo de duração do pico de 0,01 – 1 min. As varreduras de MS2 foram pareadas usando uma faixa de tolerância m/z de 0,5 Da e faixa de tolerância do tempo de retenção (TR) de 0,1 min. Os parâmetros do algoritmo de alinhamento dos picos isotópicos foram: tolerância m/z de 20 ppm, tolerância TR de 0,1 min, carga máxima de 2 e o pico mais intenso foi escolhido para representar todo o padrão isotópico. Depois dessa etapa, os arquivos .mgf para cada .mzXML original foram exportados para aprofundar a análise de rede. O alinhamento do pico foi realizado usando o módulo ‘join aligner’ (tolerância m/z : 20 ppm, peso para m/z : 75%, tolerância TR: 0,3 e peso para TR: 25%). A lista de picos foi filtrada para manter apenas os recursos de íons com dados MS2, um mínimo de dois picos seguidos e dois picos em mesmo padrão de isótopos. Picos duplicados também foram filtrados com uma varredura de 0,2 min de tolerância de TR, criando um consenso para duplicatas. Os dados foram preenchidos com uma tolerância de intensidade de 0,1%, 10 ppm de tolerância de massa e 0,05 min de tolerância de TR, e as áreas de pico foram normalizadas pela intensidade média. Picos abundantes observados no branco foram excluídos manualmente. Então, a tabela de quantificação .csv foi exportada usando módulo ‘Export to Metaboanalyst’ para mais análises estatísticas no website Metaboanalyst 5.0 (CHONG et al., 2018). O conjunto de dados foi normalizado por normalização quantílica, submetido à transformação \log_{10} e escala de Pareto para facilitar a visualização dos dados e submetido à análise de componentes principais (PCA), análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), das quais as 25 principais variáveis de importância na projeção (VIP) foram usados para construir um mapa de calor de agrupamento hierárquico, considerando a distância euclidiana e o método de agrupamento Ward.

3.2.9.3. Perfil de metabólitos

A Rede Molecular foi criada usando um fluxo de trabalho online chamado Feature-Based Molecular Networking (FBMN) do website GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>) com arquivos .mgf exportados do MZmine2 (WANG et al., 2016). Os dados foram filtrados removendo todos os íons fragmentados MS/MS de +/- 17 Da do precursor m/z . Espectros MS/MS foram filtrados por janela escolhendo apenas os seis principais íons de fragmento na janela de +/- 50 Da em todo o espectro. A tolerância da massa do íon precursor foi definida para 0,02 Da e a tolerância do íon fragmentado MS/MS para 0,02 Da. Uma rede foi então criada onde as arestas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,65 e mais de cinco picos correspondentes. Além disso, as arestas entre os dois nós foram mantidas na rede se, e somente se, cada um dos nós aparecesse nos respectivos dez nós mais semelhantes. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100 e as bordas de pontuação mais baixa foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite. O modo de pesquisa analógico foi usado pesquisando contra espectros MS/MS com uma diferença máxima de 100,0 no valor do íon precursor. Os espectros na rede foram então pesquisados contra as bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros de rede e espectros de biblioteca precisavam ter uma pontuação acima de 0,65 e pelo menos cinco picos correspondentes. A rede molecular foi visualizada usando o software Cytoscape (SHANNON et al., 2003).

Para melhorar a anotação espectral, a rede molecular foi submetida ao fluxo de trabalho da Propagação de Anotação de Rede (NAP) (DA SILVA et al., 2018) onde as 10 primeiras estruturas candidatas dos nós vizinhos e os resultados da reclassificação do Fusion foram usados para reclassificação de consenso. Os candidatos foram pesquisados dentro de uma janela de 15 ppm no GNPS e Super Natural II (BANERJEE et al., 2015). Os adutos $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$ foram esperados para a massa do íon precursor. A classificação composta foi acessada com a ferramenta ClassyFire (DJOUMBOU FEUNANG et al., 2016). Anotações *In silico* pelo NAP (MOHIMANI et al., 2017) foram integradas dentro da Rede Molecular para anotar classes químicas para os recursos MN usando a ferramenta MolNetEnhancer (ERNST et al., 2019).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações das características dos colmos e da qualidade do caldo de cana-de-açúcar são importantes para verificar o impacto de pragas e doenças na cultura, não somente no ponto de vista da produtividade, mas também no teor de sacarose, fibras, açúcares redutores e consequências financeiras aos produtores de cana.

A figura 5 e a tabela 1, apresentam os dados de caracterização da cana-de-açúcar para a variedade de cana RB867515, em uma área comercial com 13% de infestação de broca da cana-de-açúcar.

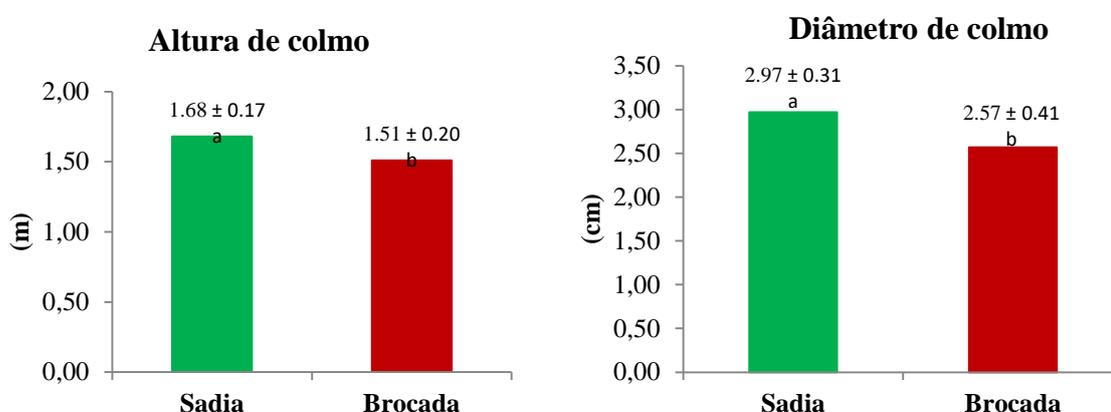


Figura 5. Altura e diâmetro médio de colmos de cana-de-açúcar sadios e infectados pelo complexo broca-podridão.

Para ambos os parâmetros avaliados, altura e diâmetro de colmo, houve diferença significativa a 5% de significância pelo teste de Tukey. A cana atacada pela broca apresentou menores alturas de colmo com uma redução de 10,12% em relação aos colmos sadios enquanto a redução no diâmetro foi na ordem de 13,47% em plantas atacadas.

Esse dano direto causado pelo ataque da broca da cana-de-açúcar se deve ao consumo da parte interna do colmo, reduzindo a massa dos entre-nós, uma vez que existe uma interrupção no transporte de água das raízes para as folhas e no transporte de nutrientes e sacarose das folhas para as raízes. A planta cresce menos, os entre-nós são encurtados e o acúmulo de sacarose é menor (LONG; HENSLEY, 1972). Isso reflete diretamente na produtividade da cana, verificando menores toneladas por hectare em canaviais com ataque da broca.

Alguns cuidados devem ser tomados em pesquisas de produtividade relacionadas ao ataque de pragas e microrganismos em cana-de-açúcar em áreas comerciais, uma vez que a queda da produtividade pode ocorrer por fatores como falta de chuva, temperaturas baixas por

longos períodos, ataque de múltiplas pragas ou doenças e ainda estágio em que a planta foi atacada pelas pragas (PETERSON et al., 1993; NILSEN; ORCUTT, 2000, ROSSATO et al., 2013).

No entanto, não somente a produtividade é afetada, mas sim a qualidade da matéria-prima. A atenção focada na qualidade permite manter a eficiência industrial e maximiza a produção de açúcar e etanol, uma vez que o processamento industrial é otimizado para altas concentrações de sacarose. A fim de verificar os danos indiretos causados pelo ataque da broca, foram avaliados teores de fibra, Pol%caldo, AR%caldo, pureza, ATR e pagamento de cana ao fornecedor (Tabela 1).

Tabela 1. Médias de valores de Fibra, Pol%caldo, Pureza, ATR e precificação de cana-de-açúcar sadia e infectada pelo complexo broca-podridão.

	Fibra (%)	Pol%caldo	AR%caldo	Pureza (Q)	ATR	R\$ ton ⁻¹ de cana
Sadia	13,06 ± 0,25 a	20,06 ± 0,81 a	0,49 ± 0,03 b	91,86 ± 0,87 a	164,35 ± 5,94 a	190,45 ± 6,88 a
Brocada	13,29 ± 0,25 a	15,71 ± 1,75 b	0,73 ± 0,11 a	84,83 ± 3,15 b	130,81 ± 12,94 b	151,59 ± 15,00 b

Nota: Para o cálculo de R\$ ton⁻¹ de cana foi utilizado o valor do ATR do mês de dezembro de 2022 publicado, pelo Consecana, a R\$ 1,1588 kg de ATR⁻¹.

Apesar de uma das rotas de defesa na cana ao ser atacada ser a lignificação da parede celular, não foi observado um aumento no teor de fibra significativo pelo teste de Tukey a 5%. Houve um aumento no valor absoluto da porcentagem de fibra, no entanto não expressivo nos parâmetros estatísticos empregados.

Valores de Pol%caldo, ou seja, teor de sacarose aparente em massa, são menores no caldo da cana atacada pela broca. A diminuição foi na ordem de 21,69% em relação ao caldo de cana sadio. Ainda, a porcentagem de AR%caldo, ou seja, açúcares redutores, foi maior em cana brocada em relação a sadia, um aumento na ordem de 48,97%. Como consequência, houve a diminuição do ATR (açúcares totais recuperáveis) em caldo de cana brocado, uma diminuição de 21,41% em relação ao caldo de cana sadio.

A queda na sacarose é causada pelo consumo interno do entre-nó pela lagarta, no entanto, não somente por esse motivo. Ocorre a inversão da sacarose em glicose e/ou frutose, pelos microrganismos *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*, quando presentes. Menores valores de Pol%caldo e maiores valores de AR%caldo resultam em menores quantidade de açúcares e etanol que serão produzidos na indústria. Houve relatos na literatura

de redução de 13% na produção de etanol por ano por cultivar quando existe a presença da broca da cana-de-açúcar (WILSON et al., 2022).

É bastante consagrado que a presença de insetos pragas causa a redução na qualidade da cana-de-açúcar (SHARMA; UPPAL, 2015). Rossato-Junior e colaboradores (2019) desenvolveram um estudo de qualidade de cana-de-açúcar com a liberação de *Diatraea saccharalis* e *Mahanarva fimbriolata* na variedade de cana SP80-3280. Observaram reduções significativas nos teores de sacarose com o ataque individual das pragas e reduções ainda maiores quando os ataques dessas pragas acontecem de forma concomitante. Observaram ainda maiores teores de Brix%caldo, ou seja, teores de açúcares redutores, em plantas atacadas.

Se em caldos de cana brocados observamos uma Pol%caldo baixa e um AR%caldo alto, a pureza da cana será menor. Isso pode ser observado nos resultados onde a cana brocada teve uma pureza de 84,83% enquanto a cana sadia apresentou valores de 91,86%. O parâmetro de pureza é utilizado no setor sucroenergético para determinar se um talhão está no ponto máximo de acúmulo de sacarose e pode ser colhido. A indústria de processamento de cana-de-açúcar aceita a matéria-prima com no mínimo 85% de pureza. Abaixo desse valor o produtor recebe penalidades nos cálculos do pagamento da matéria-prima.

Todo o processo industrial é otimizado para receber cana-de-açúcar com teores maiores que 85% de pureza, pois toda a eficiência de extração do caldo, por exemplo, está relacionada ao teor de fibra que entra no processo. Se a cana estiver com baixa pureza, significa uma quantidade menor de sacarose, maior teor de fibra e, portanto, menor eficiência de extração do caldo. Isso causa danos aos equipamentos industriais, alto uso de vapor nos processos, maior energia empregada, bagaço mais úmido, menor quantidade de açúcar produzido e menor qualidade do açúcar (ALEXANDER, 1985; MATSUOKA, 2017).

O pagamento de cana-de-açúcar ao produtor rural, leva em consideração o teor de sacarose, além das toneladas entregues da matéria-prima. Dessa forma, menores qualidades de cana, ou seja, menores valores de ATR entregam uma menor remuneração. No estudo, um produtor que entregou uma cana sadia receberia R\$ 190,45 ton⁻¹ de cana, enquanto um produtor que entregou uma cana com 13% de infestação do canavial receberia R\$ 151,59 ton⁻¹.

Não existem estudos do impacto da remuneração quando o produtor rural entrega uma cana com alta taxa de infestação de brocas. No entanto, o CONSECANA, penaliza os fornecedores pela baixa qualidade da matéria-prima empregada. Sendo assim, é um consenso a entrega de cana na indústria com o maior teor de sacarose possível.

Na década de 70, houve um alerta da sociedade acadêmica onde alguns autores discutiram a baixa quantidade de pesquisas sobre os danos da *Diatraea saccharalis* associado a fungos de podridão em cana-de-açúcar. A negligência nos estudos, segundo os autores, foi ignorar os danos por microrganismos causadores de podridão (RUINARD, 1971; OGUNWOLU et al., 1991).

Assim, mostrado que a infestação pela broca causa a redução da qualidade da cana-de-açúcar, é importante entender como os microrganismos associados a essa praga, *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*, se correlacionam nesse ambiente. Dessa forma, é possível entender as interações entre os fungos que formam o complexo.

Para isto, utilizamos o ensaio *in vitro* de cultivo pareado, onde os fungos foram inoculados em modo axênico e co-cultivo nos meios BDA e caldo de cana-de-açúcar por 10 dias (Figura 6).

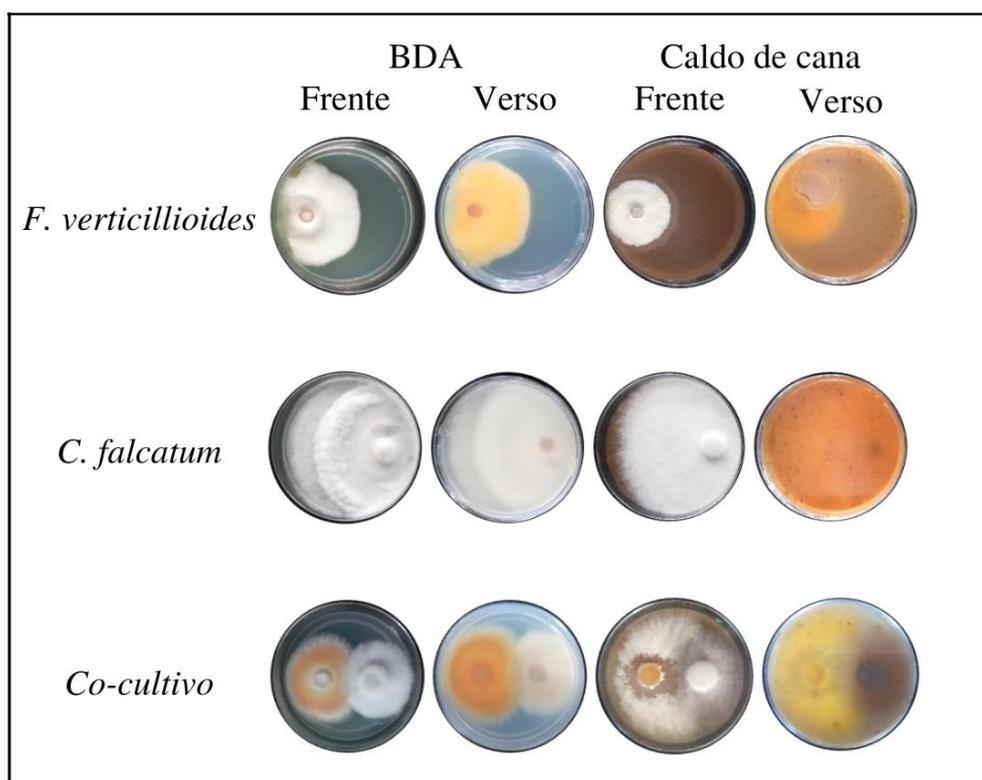


Figura 6. Ensaio biológico *in vitro* dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum* em modo axênico e co-cultivo, nos meios BDA e caldo de cana-de-açúcar, incubados a 30°C por 10 dias. Plugs de *Fusarium verticillioides* foram dispostos ao lado esquerdo e plugs de *Colletotrichum falcatum* dispostos do lado direito.

No ensaio biológico *in vitro* os fungos do complexo broca-podridão apresentaram velocidades diferentes de crescimento no mesmo meio de cultura. Em meio BDA, o *Fusarium*

verticillioides cultivado em modo axênico apresentou um crescimento médio de 50,41% da área total da placa de Petri, com hifas alaranjadas após 10 dias de incubação. O *Colletotrichum falcatum* cultivado em meio axênico, no mesmo meio, apresentou um crescimento médio de 87,91% da área total da placa, com hifas cinza claro no mesmo período.

Em meio de caldo de cana-de-açúcar o comportamento de crescimento foi o mesmo observado em meio BDA, no entanto diferentes quanto ao crescimento médio dos fungos. O *Fusarium verticillioides* cresceu em 30,19% da área total da placa de Petri, com hifas amareladas, enquanto o *Colletotrichum falcatum* cresceu 92,79% da área total da placa de Petri, com hifas cinza claro. O crescimento das hifas no meio de caldo de cana-de-açúcar, foram adjuntas ao meio, perdendo a característica fofa das hifas apresentadas em meio BDA. O menor crescimento da colônia de *F. verticillioides* em meio caldo de cana-de-açúcar e a mudança no aspecto visual do *C. falcatum*, está relacionado com a pressão osmótica do meio de cultura, uma vez que a concentração de sacarose no meio é de $0,2006 \text{ g mL}^{-1}$.

O crescimento do *Colletotrichum falcatum* ocorreu em uma taxa de $0,87 \pm 0,06 \text{ cm}$ e $0,84 \pm 0,06 \text{ cm}$ por dia nos meios BDA e caldo de cana-de-açúcar, respectivamente. Valores médio também encontrados por pesquisadores que buscam explicar as interações entre os fungos do complexo broca-podridão (COSTA, et al. 2021). Já o *Fusarium verticillioides* cresceu em uma taxa de $0,53 \pm 0,02 \text{ cm}$ e $0,46 \pm 0,02 \text{ cm}$ por dia nos meios BDA e caldo de cana-de-açúcar, respectivamente.

É conhecido que os microrganismos apresentam diferentes velocidades de crescimento, mesmo quando incubados nas mesmas condições de temperatura, pH, fotoperíodo, tempo e substrato (BECKMAN; PAYNE, 1983; CAMPBELL; REECE, 2007; TORTORA et al., 2007; WEBB et al., 2015; UPPALA et al., 2019). Uma vez que esses dois microrganismos coexistem na cultura da cana-de-açúcar e podem causar danos nas mesmas fases fenológicas da cultura, é importante conhecer a velocidade de crescimento das colônias e assim entender se pode existir um domínio de desenvolvimento sobre o outro.

Um recente estudo apresentou resultados interessantes sobre a presença isolada e conjunta de gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum* em colmos de cana-de-açúcar. Todos os colmos coletados tinham a presença dos fungos. O gênero *Fusarium* foi observado em 65% dos colmos, o gênero *Colletotrichum* em 20% dos colmos e em conjunto estavam em 15% dos colmos (COSTA et al., 2021).

Sendo os fungos *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum* fungos do complexo broca-podridão e existindo uma maior porcentagem de microrganismo do gênero *Fusarium* em colmos de cana-de-açúcar atacados pela broca, então a maior velocidade de

crescimento diário do *Colletotrichum falcatum* é justificada para que esse microrganismo possa se desenvolver e se propagar.

Ainda, nas indústrias sucroenergéticas encontramos maiores relatos de podridão vermelha (agente etiológico *Colletotrichum falcatum*) à podridão por *Fusarium* (agente etiológico *Fusarium verticillioides*). Sendo assim, mesmo em menores porcentagens o *Colletotrichum* deve apresentar mecanismos evolutivos, que podem ser químicos, para se destacar como uma das principais doenças em cana.

Quando em co-cultivo, nos meios BDA e caldo de cana-de-açúcar, os microrganismos cresceram até que houve o contato entre as colônias. Não é possível afirmar que houve inibição de um fungo sobre o outro, fisicamente. Assim, foi proposto um ensaio de incorporação nos meios de cultura de extrato fúngico para verificar se compostos especializados de *Fusarium verticillioides* podem inibir o crescimento do *Colletotrichum falcatum* e se o extrato de compostos especializados de *Colletotrichum falcatum* podem inibir o crescimento do *Fusarium verticillioides*.

As figuras 7 e 8 apresentam os resultados da ação inibitória dos extratos fúngicos de *F. verticillioides* e *C. falcatum* incorporados nos meios BDA e caldo de cana-de-açúcar, respectivamente.

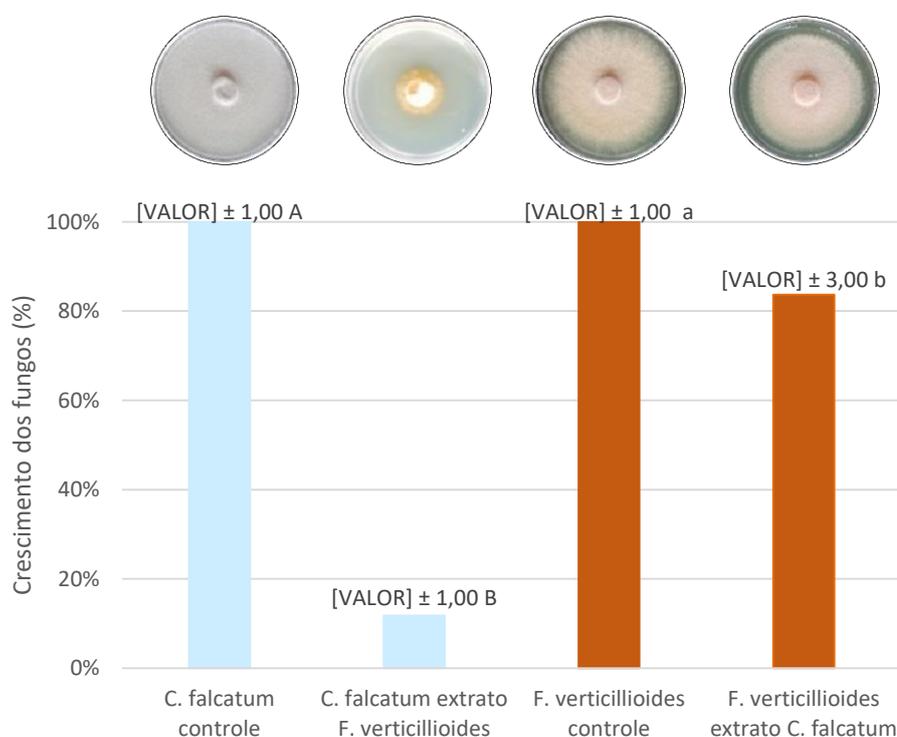


Figura 7. Porcentagem de crescimento dos fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides*, com e sem incorporação de extrato microbiológico, em placas de Petri com meio BDA, incubadas a 30°C por 06 dias.

Como os extratos fúngicos foram ressuspensos em metanol, o controle apresenta o meio de cultura acrescido de metanol. Assim foi possível ver que não houve ação do solvente sobre a inibição dos fungos, uma vez que ambos, *C. falcatum* e *F. verticillioides* cresceram em toda a placa no meio BDA.

Resultados bastante interessantes foram observados para o tratamento *Colletotrichum falcatum* cultivado em meio com extrato de *Fusarium verticillioides* em meio BDA. Houve somente 12% de crescimento fúngico o que mostra uma forte ação de compostos do *F. verticillioides* sobre o *C. falcatum*.

Fungos do gênero *Fusarium* são conhecidos por produzirem fusarinas, fumonisinas e ácido fusárico, compostos especializados tóxicos para outros microrganismos (DESJARDINS; PROCTOR, 2001; BROWN et al., 2012).

Em contrapartida, o tratamento *Fusarium verticillioides* cultivado em meio com extrato de *Colletotrichum falcatum* não apresentou uma inibição expressiva. O *F. verticillioides* cresceu em 84% da placa, sendo assim o extrato de *C. falcatum* não teve um potencial inibidor.

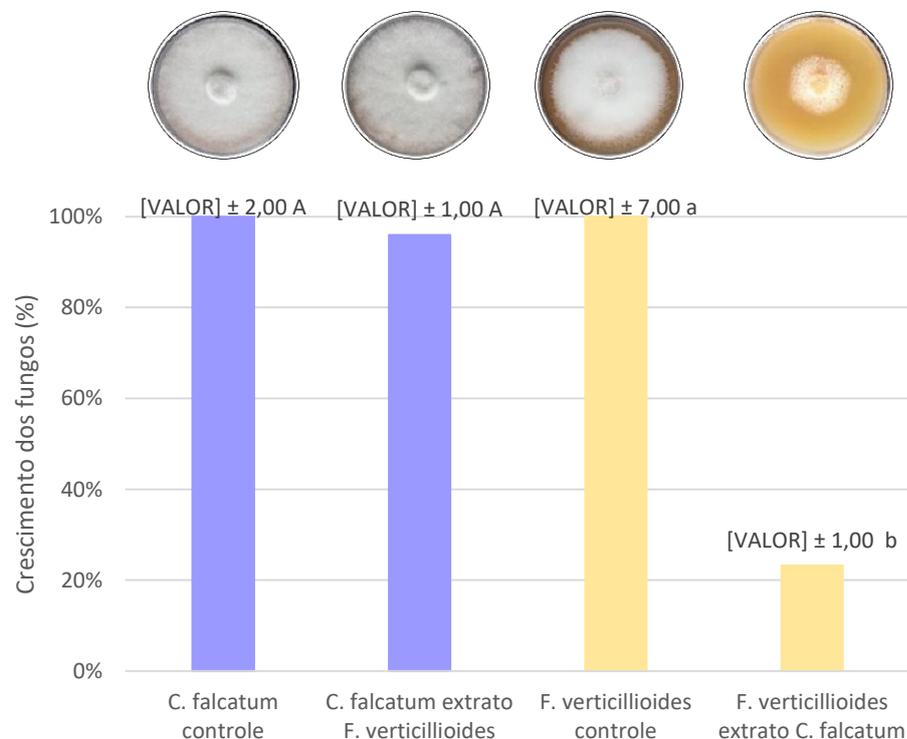


Figura 8. Percentagem de crescimento dos fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides*, com e sem incorporação de extrato microbiológico, em placas de Petri com meio caldo de cana-de-açúcar, incubadas a 30°C por 6 dias.

No entanto, em meio de caldo de cana-de-açúcar não foi observado o mesmo comportamento dos fungos que observamos no meio BDA. São meios de cultura, bastante diferentes no que diz respeito ao fornecimento de nutrientes e pressão osmótica.

No meio de cultura de caldo de cana-de-açúcar o extrato de *Fusarium verticillioides* não foi eficiente no controle do *Colletotrichum falcatum*. Apesar de ter uma redução no crescimento da colônia, essa redução foi muito pequena em relação ao controle. No entanto, é possível observar uma mudança na morfologia das hifas, onde são mais globulosas e falhadas.

Já o extrato de *Colletotrichum falcatum* sobre o *Fusarium verticillioides* mostrou um poder inibitório bastante interessante, onde o *F. verticillioides* cresceu em somente 23% da placa de Petri. Sendo esse meio o mais próximo do ambiente real dos fungos, nos faz pensar se o *Colletotrichum falcatum* tem uma vantagem evolutiva sobre o *Fusarium* nesse ambiente. Uma vez que é mais reportado ocorrência de podridão vermelha do que podridão por *Fusarium*.

A mudança no comportamento dos fungos do complexo broca-podridão do meio BDA para o meio caldo de cana-de-açúcar, nos reforça a importância de trabalhar com meio adequados para entender e simular em laboratório a interação entre esses fungos. Inclusive trabalhar com meios de cultura mais parecidos com o ambiente que o fitopatógeno atua, passa maior credibilidade nos resultados de inibição por extratos de atividade antifúngica.

O meio BDA, apesar de ser o meio mais usado para experimentos com fungos, tem sido estudado contra outros tipos de meio de cultura uma vez que seu preço vem aumentando em formulações prontas (MARTÍNEZ-MORENO et al., 2021).

As figuras 9 e 10 apresentam análises MS/MS de extratos de compostos especializados dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum*, nos meios de cultura BDA e caldo de cana-de-açúcar, respectivamente, organizadas em redes moleculares e que pode ser visualizada pelo software Cytoscape.

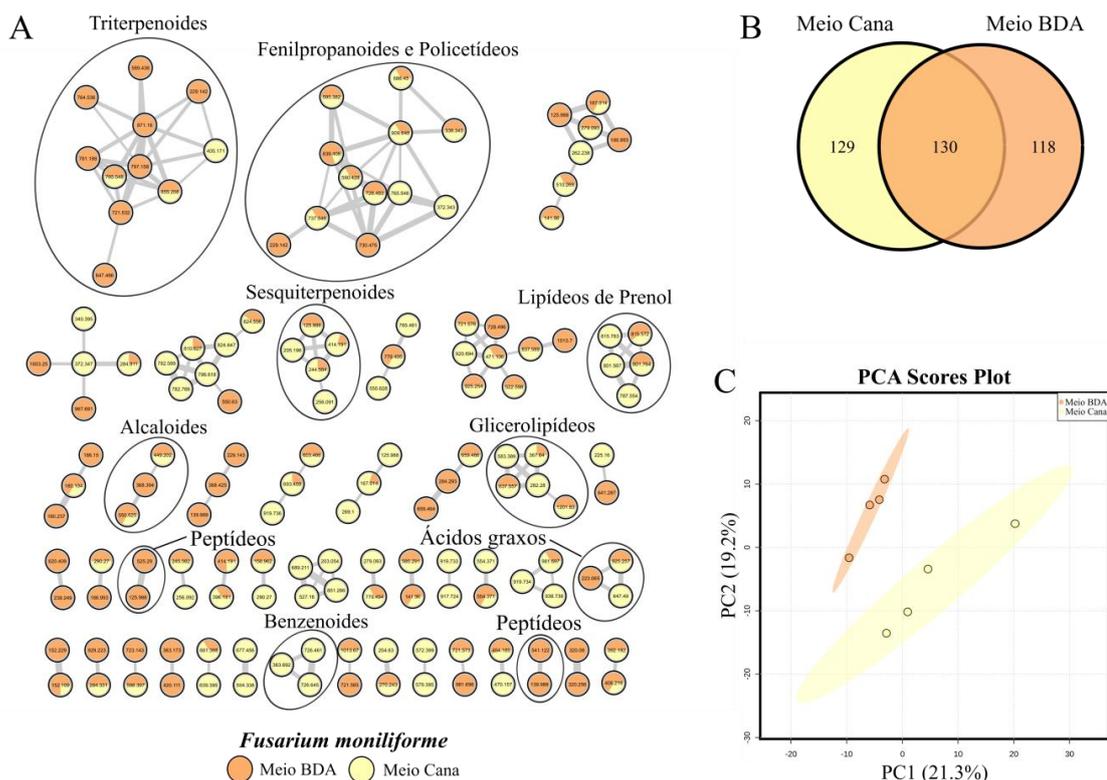


Figura 9. Rede molecular representando a química espacial de metabólitos produzidos por *F. verticillioides* em médio BDA e caldo de cana-de-açúcar, com algumas representações de classes químicas anotadas pela ferramenta *in silico* (A). Singletons foram excluídos da imagem, no entanto foram quantificados no diagrama de Venn (B). Análise scores plot da PCA dos extratos de *F. verticillioides* em meio BDA e caldo de cana-de-açúcar, com os dois primeiros componentes explicando 40,5% da variância (regiões com 95% de significância são mostradas) (C).

Para visualizar o espaço químico coberto pelos grupos de amostras e a distribuição das “features” em cada tratamento, construímos a rede molecular e realizamos anotações automáticas de predição de classes químicas para as famílias moleculares utilizando a ferramenta *in silico* (anotações de nível 3 do MSI) detectadas para *F. verticillioides* e *C. falcatum* em ambas as condições de cultura.

Os agrupamentos aconteceram através da similaridade do espectro padrão de fragmentação e cada nó representa um íon. Assim, íons estruturalmente semelhantes, são agrupados e formam as classes químicas. Para *F. verticillioides*, algumas das classes de compostos anotadas pelo MolNetEnhancer foram triterpenóides, sesquiterpenóides, benzenóides, lipídios de prenil, alcalóides, peptídeos, ácidos graxos, glicerolipídeos, fenilpropanóides e policetóides (Figura 9A).

Ambos os meios, BDA e caldo de cana-de-açúcar, levou a detecção de íons encontrados exclusivamente em uma das condições. Através do diagrama de Venn foi possível observar que para *F. verticillioides* foram detectados um total de 377 íons, sendo 130

íons encontrados em ambos os meios de cultura, íons exclusivos em meio de caldo de cana-de-açúcar somaram 129 íons, e íons exclusivos produzidos em meio BDA, 118 íons (Figura 9B).

As classes químicas detectadas apresentam importantes atividades antifúngicas contra fitopatógenos. Fenilpropanóides tem uma ação antifúngica contra *Fusarium oxysporium* e *Botrytis cinerea* (KFOURY et al., 2016), triterpenóides tem ação antifúngica contra *Septoria tritici*, *Phytophthora infestans* e *Botrytis cinerea* (SANTOS et al., 2019), ácidos graxos tem ação antifúngica contra *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pyrenophora avenae* e *Crinipellis pernicioso* (WALTERS et al., 2004), sesquiterpenóides tem ação antifúngica contra *Sclerotinia sclerotiorum* (LI et al., 2016b), lipídeos de prenol, como a quinona, tem ação antifúngica contra *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum gloeosporioides* (MEAZZA et al., 2003), alcalóides tem ação antifúngica contra microrganismos do gênero *Aspergillus* (SALAH et al., 2022) e peptídeos tem ação antifúngica contra *Alternaria alternata* (XU et al., 2011).

Benzenóides são compostos aromáticos e pouco solúveis em água. Apesar da anotação de classe química, essa foi encontrada somente em meio de caldo de cana-de-açúcar e esse extrato não teve ação fungistática contra o *C. falcatum* em meio de caldo de açúcar, portanto a ação fungistática não ocorreu por compostos dessa classe.

Para *C. falcatum*, o MolNetEnhancer forneceu a classificação química putativa dos “clusters” abrangendo diterpenóides, dipeptídeos, depsipeptídeos, lipídios de prenol, glicerolipídeos e ácidos graxos (Figura 10A).

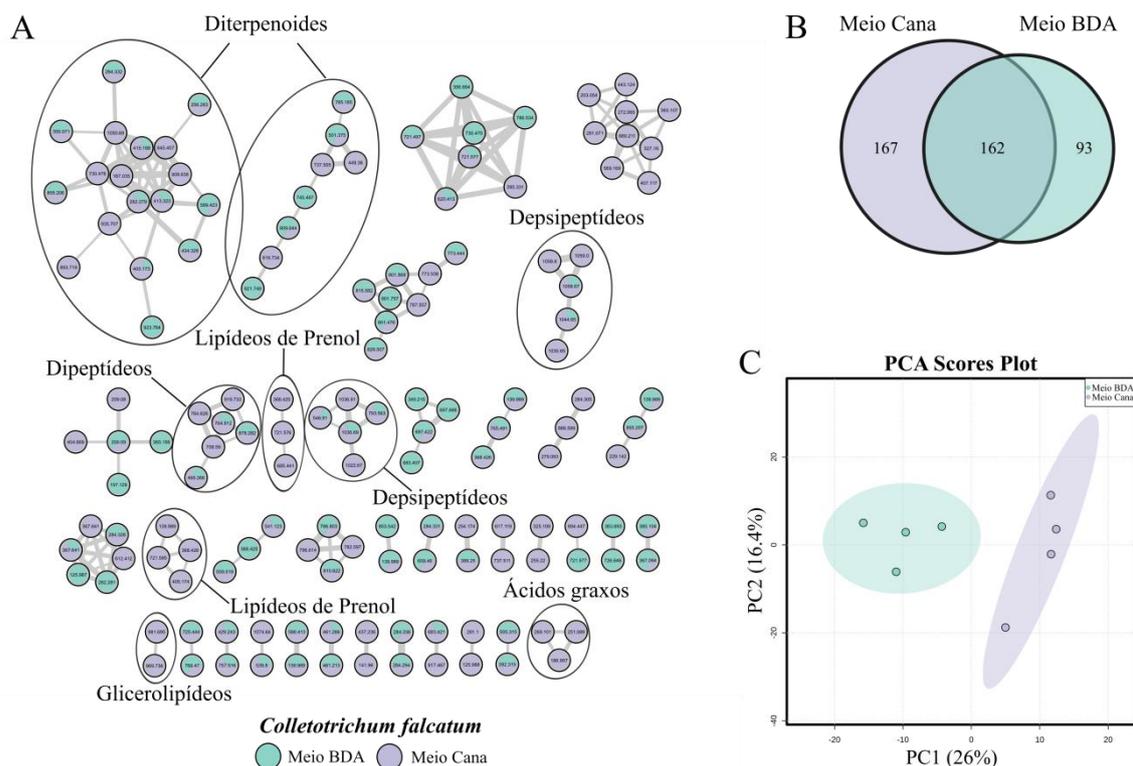


Figura 10. Rede molecular representando a química espacial de metabólitos produzidos por *C. falcatum* em médio BDA e caldo de cana-de-açúcar, com algumas representações de classes químicas anotadas pela ferramenta *in silico* (A). Singletons foram excluídos da imagem, no entanto foram quantificados no diagrama de Venn (B). Análise scores plot da PCA dos extratos de *C. falcatum* em meio BDA e caldo de cana-de-açúcar, com os dois primeiros componentes explicando 42,4% da variância (regiões com 95% de significância são mostradas) (C).

Através do diagrama de Venn foi possível observar que para *C. falcatum* foram detectados um total de 422 íons, sendo 162 íons encontrados em ambos os meios de cultura, íons exclusivos em meio de caldo de cana-de-açúcar somaram 167 íons, e íons exclusivos produzidos em meio BDA, 93 íons (Figura 10B).

Assim como já descritas para *F. verticillioides*, as classes químicas encontradas no extrato de *C. falcatum* também apresentam atividades antifúngicas. Diterpenóides tem ação antifúngica contra *Botrytis cinerea* (COTORAS et al., 2001) e dipsipeptídeos tem ação antifúngica contra *Alternaria solani* (GAO et al., 2020).

As classes químicas ácidos graxos, glicerolipídeos e lipídeos de prenil foram observadas em extratos de *C. falcatum* cultivados em meio de caldo de cana-de-açúcar e não foram observados no extrato desse mesmo microrganismo em meio BDA. Provavelmente as rotas de produção desses compostos dependem de em meio mais rico em nutrientes, como é o caldo de cana-de-açúcar.

As réplicas de todos os tratamentos, *F. verticillioides* e *C. falcatum* nos dois meios de culturas, foram agrupadas no PCA “scores plots” e não houve sobreposição entre os tratamentos (Figuras 9C, 10C), indicando a reprodutibilidade do experimento.

Para selecionar metabólitos detectados em abundância nos extratos bioativos, nós comparamos as features na análise de volcano plot (com um limite de mudança de dobra >10 associado com o valor de $P < 0,05$) e os 20 metabólitos com alto VIP scores (que discrimina metabólitos com alta influência na diferenciação dos grupos).

A figura 11A apresenta um diagrama de dispersão (volcano plot) com os íons obtidos dos extratos de *F. verticillioides* em meio BDA e caldo de cana-de-açúcar. Como esse extrato originou uma ação fungistática contra o *C. falcatum* em meio BDA, então podemos afirmar que existem compostos produzidos nesse meio, diferentes dos produzidos em meio de caldo de cana-de-açúcar, podendo sozinho ou em conjunto inibir o crescimento micelial de *C. falcatum* no meio de cultura em questão. Dessa forma, foram verificados quais os íons potencialmente responsáveis por essa diferenciação de compostos produzidos nos dois meios de cultura.

Para *F. verticillioides* em meio BDA um total de 9 metabólitos foram detectados (Figuras 11A, 11B) e para *C. falcatum* em caldo de cana-de-açúcar 10 metabólitos foram detectados (Figuras 11C, 11D). Esses 9 metabólitos, de cada volcano plot, são os mais próximos ao topo do diagrama e mais distantes do centro, mostrando um alto grau de significância estatística e acentuada variação de magnitude. Esses íons foram anotados putativamente pelo Sirius + CSI:FingerID e CANOPUS (Tabela 2).

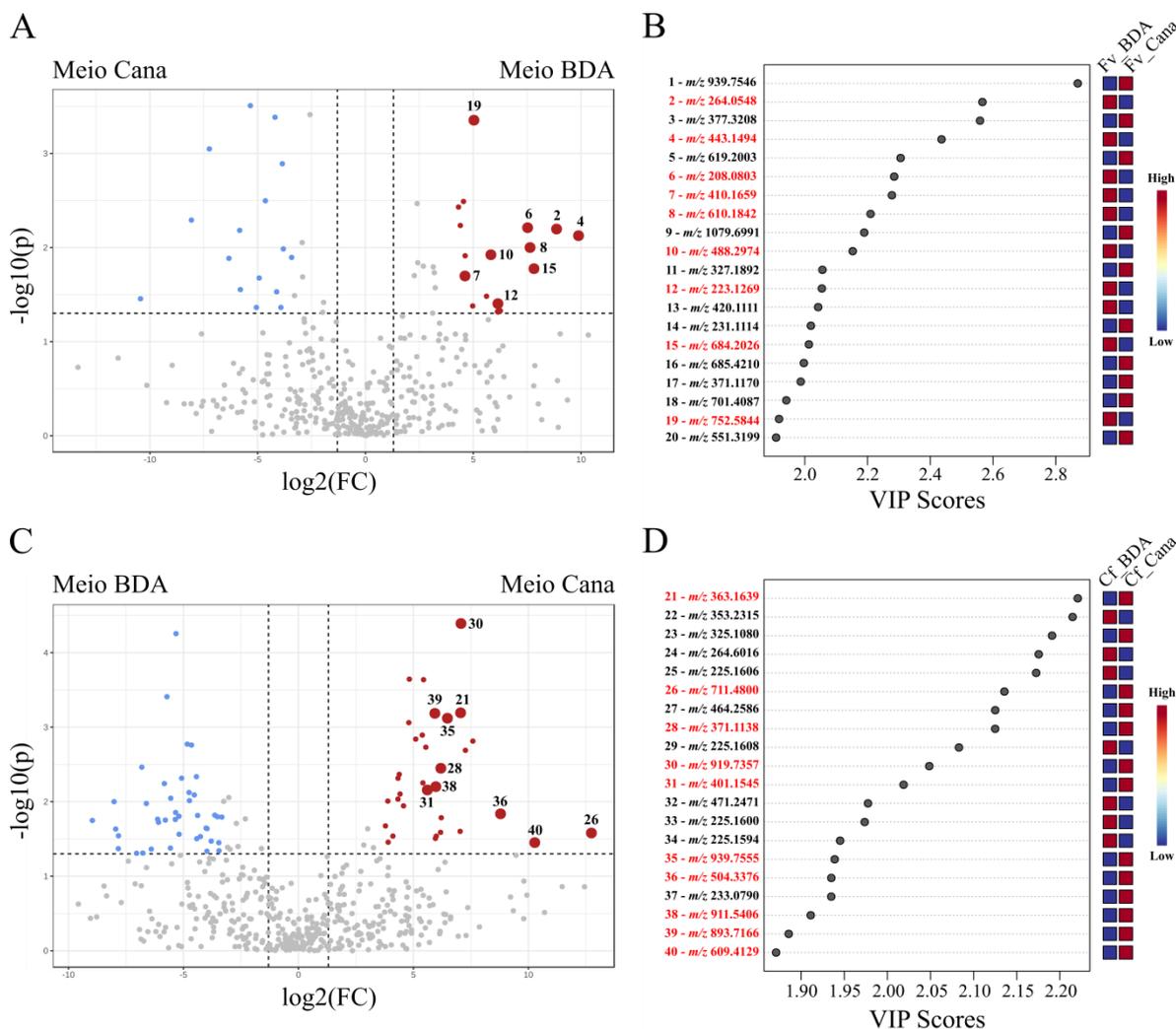


Figura 11. Volcano plot de extratos de *F. verticillioides* em meio BDA e caldo de cana-de-açúcar (A). Os 20 principais compostos classificados com base na PLS-DA VIP scores em extrato de *F. verticillioides* (B). Volcano plot de extratos de *C. falcatum* em meio BDA e caldo de cana-de-açúcar (C). Os 20 principais compostos classificados com base na PLS-DA VIP scores em extrato de *C. falcatum* (D).

Foram 9 os íons responsáveis pela diferenciação dos compostos produzidos pelo *F. verticillioides*. São eles os picos 2 (ácidos graxos e conjugados), 4 e 8 (N-acil alfa-aminoácidos e derivados), 6 (não anotado), 7 e 10 (aminoácidos e derivados), 12 (sesquiterpenóides), 15 (alfa-aminoácidos e derivados) e 19 (esteróides e derivados).

No ensaio biológico de incorporação do extrato de *C. falcatum* houve ação fungistática contra o *F. verticillioides* em meio de caldo de cana-de-açúcar. Segundo o volcano plot 10 são os íons responsáveis pela diferenciação de compostos produzidos por *C. falcatum*. São eles os picos 21 (aminoácidos e derivados), 26 (esteróides e derivados), 28 (benzenóides), 30, 38, 39 e 40 (oligopeptídeos), 31 (não anotado), 35 (depsipeptídeos) e 36 (macrolídeos e derivados).

Atualmente o controle desses fungos do complexo broca-podridão são realizados com o uso de variedades resistentes, ou indiretamente com o controle da broca e manejo de palhadas e maquinários (VISWANATHAN; SAMIYAPPAN, 2000). No entanto, diversos países, assim como o Brasil, tem relatado as doenças de podridão vermelha e podridão por *Fusarium*, na ausência da broca da cana-de-açúcar (RAID; ROTT, 2015; SIMON et al., 2016).

O fungicida Muneo é o único registrado para controle de *Colletotrichum falcatum* em cana-de-açúcar, no entanto não existe registros de fungicidas contra o *Fusarium verticillioides* para cana-de-açúcar no Brasil. Assim, foi proposto um ensaio de incorporação, em dois meios de cultura, de fungicidas comerciais e extratos brutos naturais de planta, no caso o uso de ponteiros de cana-de-açúcar, no controle dessas doenças.

Tabela 2. Principais “features” anotadas de extratos de *F. verticillioides* em meio BDA e em extratos de *C. falcatum* em meio de caldo de cana-de-açúcar.

Pico	Microrganismo	Tr (min)	Fórmula molecular	Aduto	<i>m/z</i>			Anotação putativa (Nível 3 MSI)
					Observado	Teórico	$\Delta m/z$ (ppm)	
2	<i>F. verticillioides</i>	2,84	C ₁₀ H ₁₉ NO ₂ S ₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	264,0548	264,0556	3,02	Ácidos graxos e conjugados
4	<i>F. verticillioides</i>	2,66	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₈ S	[M + H] ⁺	443,1494	443,1493	0,22	N-Acil alfa-aminoácidos e derivativos
6	<i>F. verticillioides</i>	2,7	C ₅ H ₁₁ N ₄ O ₅	[M + H] ⁺	208,0803	208,0813	4,80	Não anotado
7	<i>F. verticillioides</i>	8,7	C ₁₇ H ₂₃ N ₅ O ₇	[M + H] ⁺	410,1659	410,1670	2,68	Aminoácidos e derivativos
8	<i>F. verticillioides</i>	14,93	C ₂₂ H ₃₃ N ₇ O ₁₁	[M + K] ⁺	610,1842	610,1869	4,42	N-Acil alfa-aminoácidos e derivativos
10	<i>F. verticillioides</i>	11,37	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	[M + Na] ⁺	488,2974	488,2982	1,63	Aminoácidos e derivativos
12	<i>F. verticillioides</i>	6,98	C ₁₄ H ₂₁ ClO	[M - H ₂ O + H] ⁺	223,1269	223,1248	9,41	Sesquiterpenóides
15	<i>F. verticillioides</i>	14,92	C ₄₀ H ₅₁ N ₅ O ₄	[M + K] ⁺	684,2026	684,2007	2,77	Alfa-aminoácidos e derivativos
19	<i>F. verticillioides</i>	14,71	C ₄₇ H ₇₇ NO ₆	[M + H] ⁺	752,5844	752,5834	1,32	Esteróides e derivativos
21	<i>C. falcatum</i>	2,87	C ₁₂ H ₂₂ N ₆ O ₇	[M + H] ⁺	363,1639	363,1622	4,68	Aminoácidos e derivativos
26	<i>C. falcatum</i>	10,94	C ₃₉ H ₆₈ N ₄ O ₅	[M + K] ⁺	711,4800	711,4821	2,95	Esteróides e derivativos
28	<i>C. falcatum</i>	3,26	C ₁₈ H ₂₀ O ₇	[M + Na] ⁺	371,1138	371,1101	9,97	Benzenóides
30	<i>C. falcatum</i>	12,82	C ₅₀ H ₆₄ N ₈ O ₇	[M + H] ⁺	919,7357	919,7318	4,24	Oligopeptídeos
31	<i>C. falcatum</i>	3,04	C ₂₄ H ₂₆ O ₃	[M + K] ⁺	401,1545	401,1513	7,97	Não anotado
35	<i>C. falcatum</i>	15,03	C ₅₁ H ₉₈ N ₆ O ₉	[M + H] ⁺	939,7555	939,7468	9,25	Depsipeptídeos
36	<i>C. falcatum</i>	6,69	C ₂₆ H ₄₉ NO ₆ S	[M + H] ⁺	504,3376	504,3353	4,56	Macrolídeos e derivativos
38	<i>C. falcatum</i>	10,9	C ₅₁ H ₆₆ N ₁₂ O ₄	[M + H] ⁺	911,5406	911,5402	0,43	Oligopeptídeos
39	<i>C. falcatum</i>	14,52	C ₄₄ H ₈₈ N ₁₄ O ₅	[M + H] ⁺	893,7166	893,7134	3,58	Oligopeptídeos
40	<i>C. falcatum</i>	11,03	C ₂₉ H ₅₂ N ₈ O ₆	[M + H] ⁺	609,4129	609,4082	7,71	Oligopeptídeos

A figura 12 apresenta dados de crescimento micelial de *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum* em meio BDA incorporado com Fox ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de princípio ativo no meio de cultura), Muneo ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de princípio ativo no meio de cultura), extrato metanol:água 50% (Extr. MeOH Água) ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$), e extrato metanólico (Extr. MeOH) ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) de ponteiro de cana-de-açúcar.

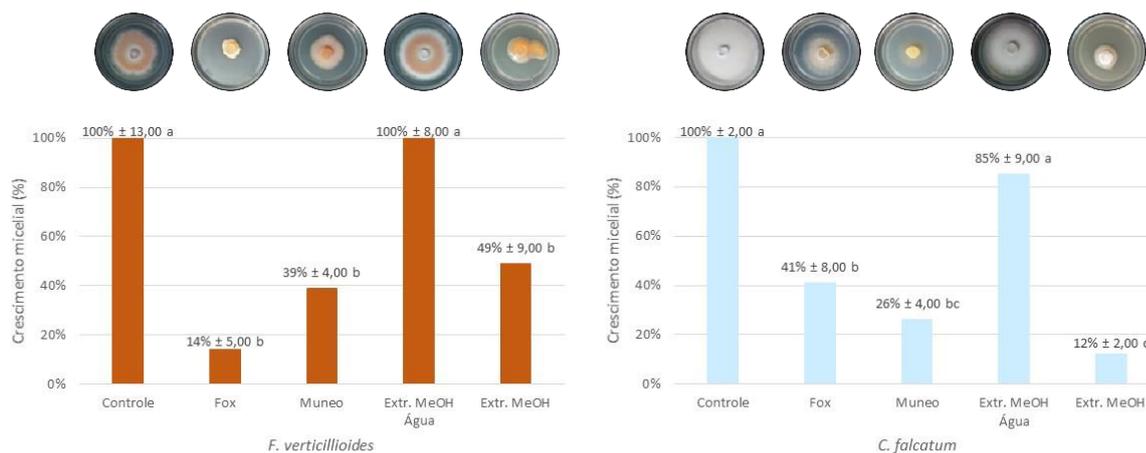


Figura 12. Crescimento micelial de *F. verticillioides* e *C. falcatum* em meio BDA incorporado com fungicidas e extratos brutos de ponteiro de cana-de-açúcar.

No ensaio *in vitro* de *F. verticillioides* crescendo em meio BDA, houve uma inibição média de crescimento micelial do fungo de 86% com Fox incorporado, 61% com Muneo incorporado, 0% com extrato metanol:água de ponteiro de cana-de-açúcar incorporado e 51% com extrato metanólico de ponteiro de cana-de-açúcar incorporado.

Já para *C. falcatum* o comportamento de crescimento micelial do fungo foi outro, onde o Fox inibiu somente 59%, o Muneo 74%, o extrato metanol:água 15% e o extrato metanólico inibiu 88%.

Para avaliar se o comportamento de inibição é o mesmo com a presença simultânea dos dois fungos, então o ensaio foi conduzido em co-cultivo e os resultados estão apresentados na figura 13.

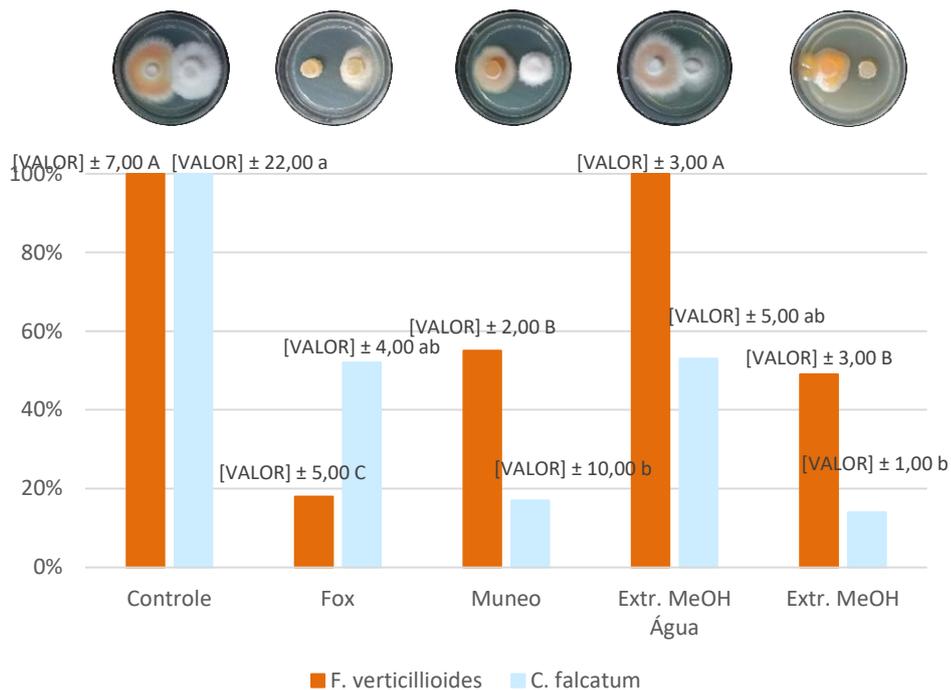


Figura 13. Crescimento micelial de *F. verticillioides* e *C. falcatum*, em co-cultivo, em meio BDA incorporado com fungicidas e extrato de ponteiro de cana-de-açúcar.

Os resultados do co-cultivo em meio BDA foram similares ao encontrado em modo axênico no cultivo dos fungos. O Fox apresentou melhor inibição do *F. verticillioides* enquanto o Muneo apresentou melhor inibição do *C. falcatum*. O extrato de ponteiro da fração metanol:água 50% não apresentou ação fungicida sobre os fungos, somente ação fungistática contra *C. falcatum*, no entanto de pouca relevância.

A fim de verificar o comportamento dos fungicidas e dos extratos de ponteiro da cana-de-açúcar contra os fungos do complexo broca-podridão em um ambiente mais próximo a realidade de campo, foi realizado um ensaio biológico *in vitro* de cultivo do *F. verticillioides* e do *C. falcatum* em meio de caldo de cana-de-açúcar incorporado (Figura 14).

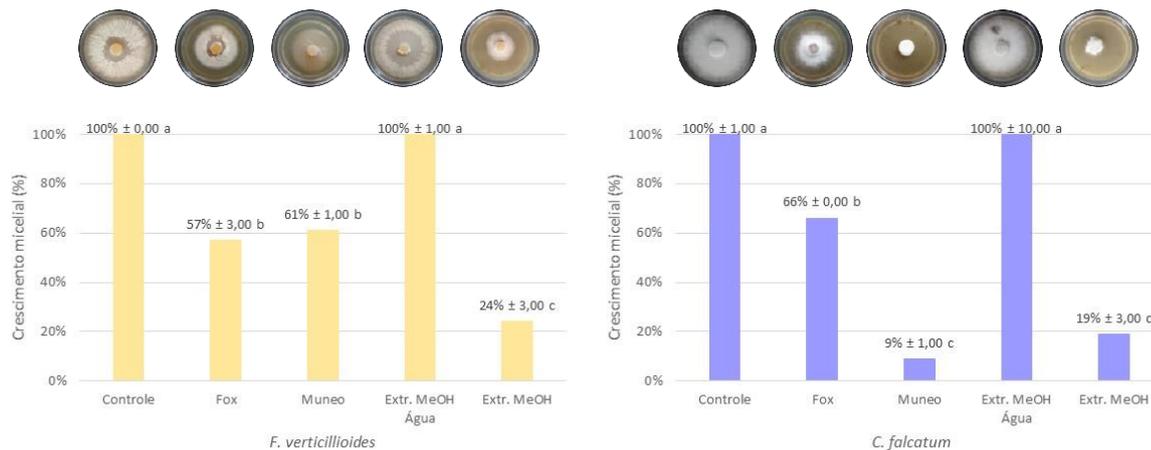


Figura 14. Crescimento micelial de *F. verticillioides* e *C. falcatum* em meio caldo de cana-de-açúcar incorporado com fungicidas e extratos brutos de ponteiro de cana-de-açúcar.

Em meio de caldo de cana-de-açúcar os resultados de inibição dos fungicidas para controle de *F. verticillioides* não foram muito expressivos. Houve somente 43% de inibição pelo Fox e 39% de inibição do Muneo. O extrato metanol:água não apresentou inibição nesse meio, no entanto o extrato metanólico apresentou uma inibição de 76%.

Para *C. falcatum* em meio de caldo de cana-de-açúcar o Fox não foi eficiente no controle, inibindo somente 33% do fungo, enquanto o Muneo controlou 91% do crescimento micelial. O extrato metanol:água mais uma vez não foi eficiente no controle do *C. falcatum*, no entanto houve significativo controle, 81%, do extrato metanólico incorporado no meio de cultura.

Assim como no ensaio biológico em meio BDA, ao meio de caldo de cana-de-açúcar também foi realizado a incorporação dos fungicidas e dos extratos de ponteiro para verificar se o comportamento inibitório se mantinha em co-cultivo, como no modo axênico de cultivo.

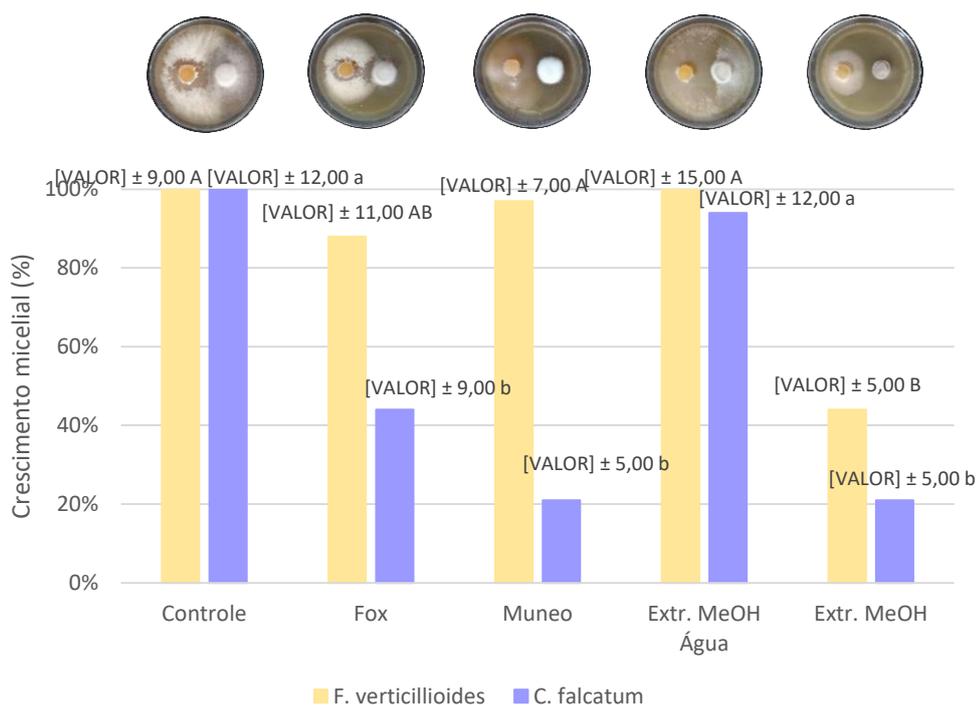


Figura 15. Crescimento micelial de *F. verticillioides* e *C. falcatum*, em co-cultivo, em meio de caldo de cana-de-açúcar incorporado com fungicidas e extrato de ponteiro de cana-de-açúcar.

O fungicida Fox não foi eficiente no controle do *F. verticillioides* na dosagem de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, inibindo somente 12% do crescimento e apresentou média inibição, 56% do *C. falcatum*. O Muneo apresentou um bom controle do *C. falcatum*, 79%, no entanto somente 3% de inibição do *F. verticillioides*. O extrato metanol:água não apresentou controle dos fungos, no entanto o extrato metanólico apresentou importante controle dos dois fungos, onde o *F. verticillioides* foi inibido 56% e o *C. falcatum* 79%.

Dentre os fungicidas, o Muneo foi o que melhor controlou *C. falcatum* nos dois meios de cultura. Esse produto comercial apresenta dois princípios ativos inseticidas, alfacipermetrina (piretróide) e fipronil (pirazol), e um fungicida de princípio ativo piraclostrobina (estrobilurina). A recomendação é o uso no sulco de plantio ou no rizoma da planta em áreas de soqueira. Assim, minimiza a ação do microrganismo nas fases iniciais de desenvolvimento da planta.

O Fox é um produto comercial de princípio ativo com dois fungicidas, trifloxistrobina (estrobilurina) e protioconazol (triazolintiona). Não tem registro para cana-de-açúcar, no entanto é utilizado no controle de algumas espécies de *Colletotrichum* em algodão, feijão e soja, assim como para uma espécie de *Fusarium* em trigo. Dessa forma foi utilizado no estudo para verificar potencial controle. No entanto, foram observados controles eficientes desse fungicida para *Fusarium verticillioides* somente no meio BDA e um controle médio

para *Colletotrichum falcatum* nos dois meios de cultura. Outros estudos devem ser conduzidos com combinações de princípios ativos para melhor combate aos fungos do complexo broca-podridão.

Um estudo *in vitro* conduzido com 3 fungicidas contra o *Colletotrichum falcatum* observou um controle de 100% do fungo quando empregado uma combinação de princípios ativos de tiofanato metil + piraclostrobina e tiofanato metil + trifloxistrobina a 10 ppm (MALATHI et al., 2017).

O extrato metanólico de ponteiro de cana-de-açúcar apresentou eficiência no controle de *F. verticillioides* e *C. falcatum* em ambos os meios de cultura. Como o método de extração empregado no ponteiro da cana-de-açúcar visa a extração de compostos fenólicos, podemos dizer que essa classe química pode ser a responsável pela inibição no crescimento micelial dos ensaios biológicos *in vitro*.

Estudos são conduzidos com diversos extratos de plantas objetivando testar sua ação antifúngica, são eles alho (*Allium sativum*), neen (*Azadirachta indica*), figueira brava (*Datura stramonium*), eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*), moringa (*Moringa oleífera*) e gengibre (*Zingiber officinale*) (ABBAS et al., 2016). No entanto, são plantas medicinais, temperos ou plantas consagradas como produtoras de óleos essenciais que apresentam compostos de ação inibitória.

A proposta nesse trabalho foi utilizar um material da própria cana-de-açúcar, abundante na indústria sucroenergética e que é um resíduo que fica no campo após cada colheita. Não existe relatos na literatura de estudo do ponteiro contra os fungos que atacam a cana.

Para verificar quais os compostos presentes no extrato do ponteiro de cana-de-açúcar, foi realizada uma análise em UPLC-qTOF-MS/MS e o resultado está apresentado na figura 16.

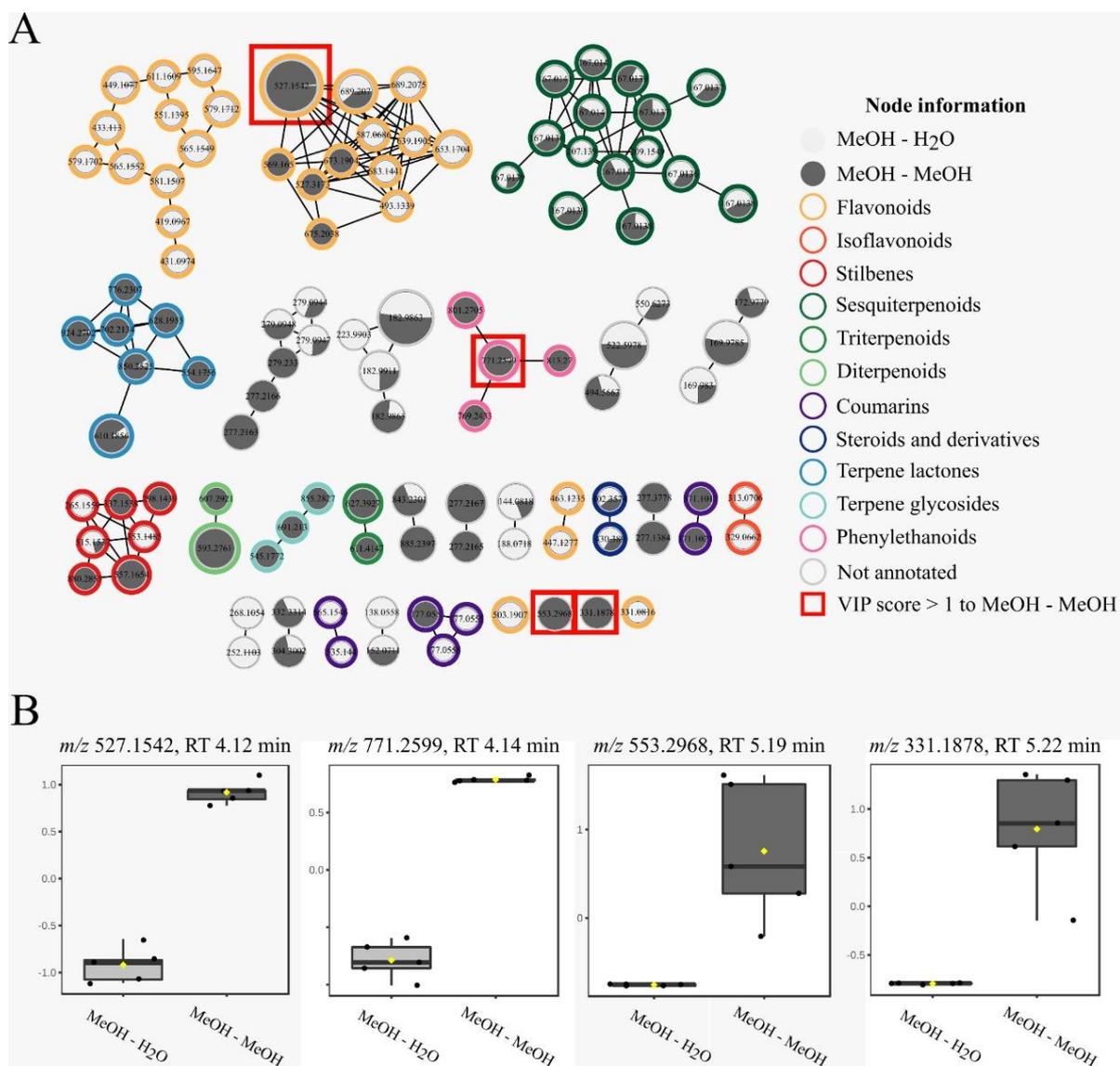


Figura 16. Rede molecular representando a química espacial de metabólitos dos extratos MeOH Água e metanólico do ponteiro de cana-de-açúcar, com algumas representações de classes químicas anotadas pela ferramenta *in silico* (A). Boxplot dos íons de maior representatividade na diferenciação dos extratos MeOH Água e metanólico (B).

Conforme já descrito nas redes moleculares de extratos microbiológicos, os agrupamentos aconteceram através da similaridade do espectro padrão de fragmentação e cada nó representa um íon. Assim, íons estruturalmente semelhantes, são agrupados e formam as classes químicas. A figura 16A apresenta os agrupamentos de classes químicas para ambos os extratos de ponteiro de cana-de-açúcar (MeOH Água e metanólico). E as anotações do MolNetEnhancer foram flavonóides, isoflavonóides, estilbenos, sesquiterpenóides, triterpenóides, diterpenóides, cumarinas, esteróides e derivados, terpenos lactonas, terpenos glicosídeos e feniletanóides. Algumas classes químicas não foram anotadas. Os nós em destaques nos quadrados vermelhos representam, íons m/z responsáveis pela diferenciação na PCA e no heatmap dos extratos metanólicos.

Dois dos nós responsáveis pela diferenciação dos extratos tiveram sua classe química anotada, são eles m/z 527,1542 um flavonóide e o m/z 771,2599 um feniletanóide. Os íons m/z 553,2968 e m/z 331,1878 não apresentam anotações.

Fitoquímicos da cana-de-açúcar como fenólicos, flavonóides e antocianidinas ajudam a planta de aclimatar melhor no campo, pois desempenham importante papel na tolerância do estresse biótico e abiótico devido suas características antimicrobiana e antioxidante (FENG et al., 2014). Flavonóides são muito conhecidos pelas suas atividades antifúngicas e antibactericida e são encontrados em todas as partes da cana-de-açúcar, inclusive nas cascas do colmo (SINGH et al. 2014; GOMES et al. 2020; RAO et al., 2022).

Flavonóides tem um papel importante nas plantas, pois atuam no sistema de defesa contra patógenos (ORTUÑO et al., 2012). Um estudo *in vivo* de pós colheita de citrus mostrou que os frutos foram capazes de hidrolisar flavonóides em resposta as infecções formando novos composto de flavonóides associados a defesa (COSTA et al., 2020).

Foi possível fazer anotação do composto do m/z 527,1542 como Tricin 5-glucoside, um flavonóide derivado de monossacarídeo, um polifenol produzido pelas plantas. Esse composto foi um dos maiores responsável pela diferenciação entre os extratos MeOH Água e metanólico, segundo a PLS-DA e o heatmap (Figura 18), e pode ser um dos compostos responsáveis pelas inibições do extrato metanólico contra os fungos do complexo broca-podridão. Ainda, no boxplot (Figura 16B) foi o que apresentou menor variabilidade de desvio-padrão dos dados em ambos os extratos.

O extrato MeOH Água também apresenta agrupamentos de flavonóides anotados, no entanto não apresentou alta atividade fungistática no ensaio biológico contra os fungos do complexo broca-podridão. Isso se deve aos teores de flavonóides presentes naquela amostra e até mesmo ao tipo de estrutura de flavonóide desse extrato (CLOSE; MC ARTHUR, 2002).

A figura 17 apresenta algumas anotações nível 3 de flavonóides encontrados nos extratos de ponteiro de cana-de-açúcar.

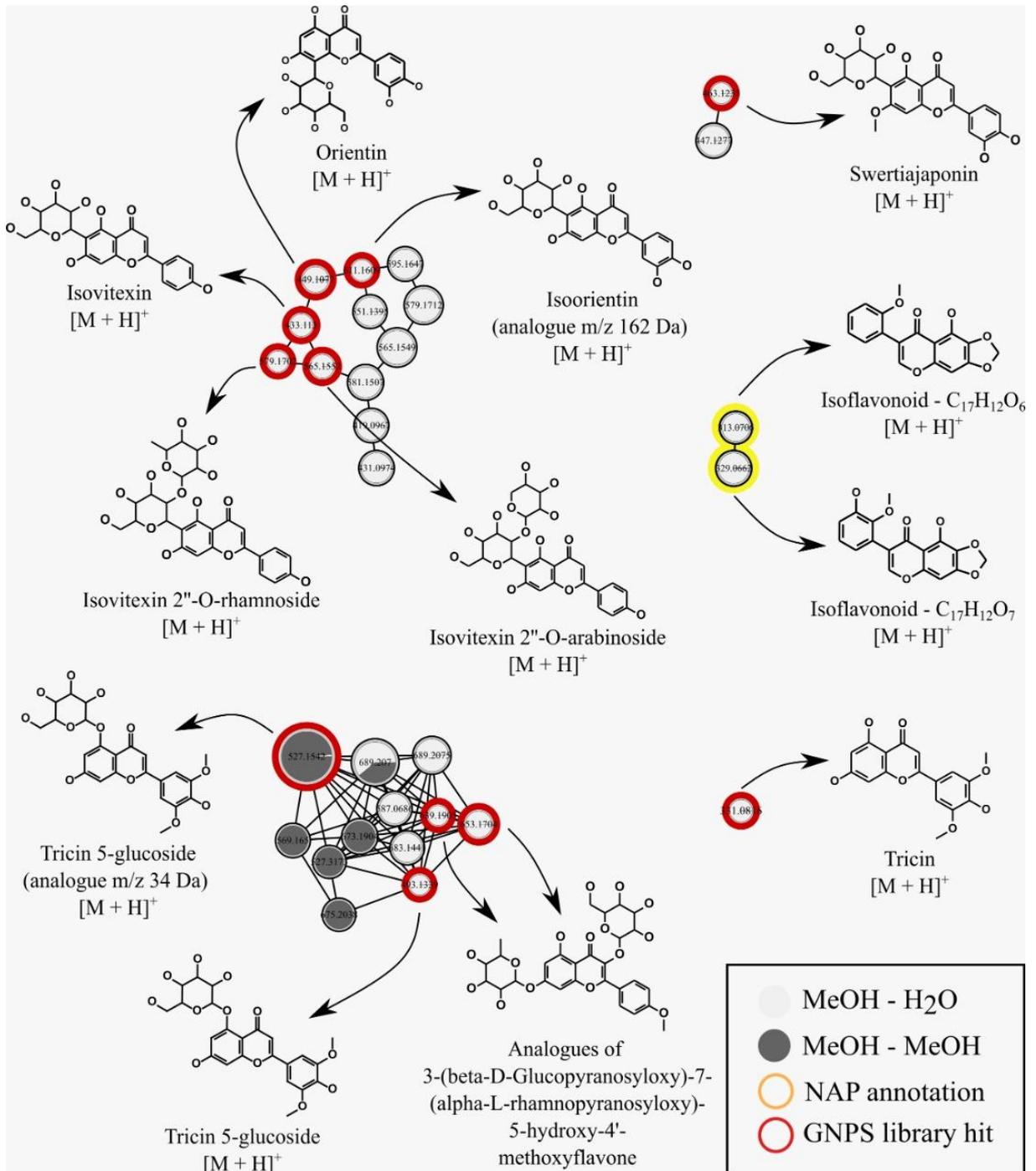


Figura 17. Anotações nível 3 de flavonóides presentes no extrato de ponteiro de cana-de-açúcar.

Dentre os flavonóides anotados em extratos MeOH Água de ponteiro de cana-de-açúcar estão orientina, isovitexina, isorientina, tricina e isoflavonóides. Já no extrato metanólico obtivemos anotação de Tricin 5-glucoside. As anotações foram realizadas pelas bibliotecas do GNPS e do NAP.

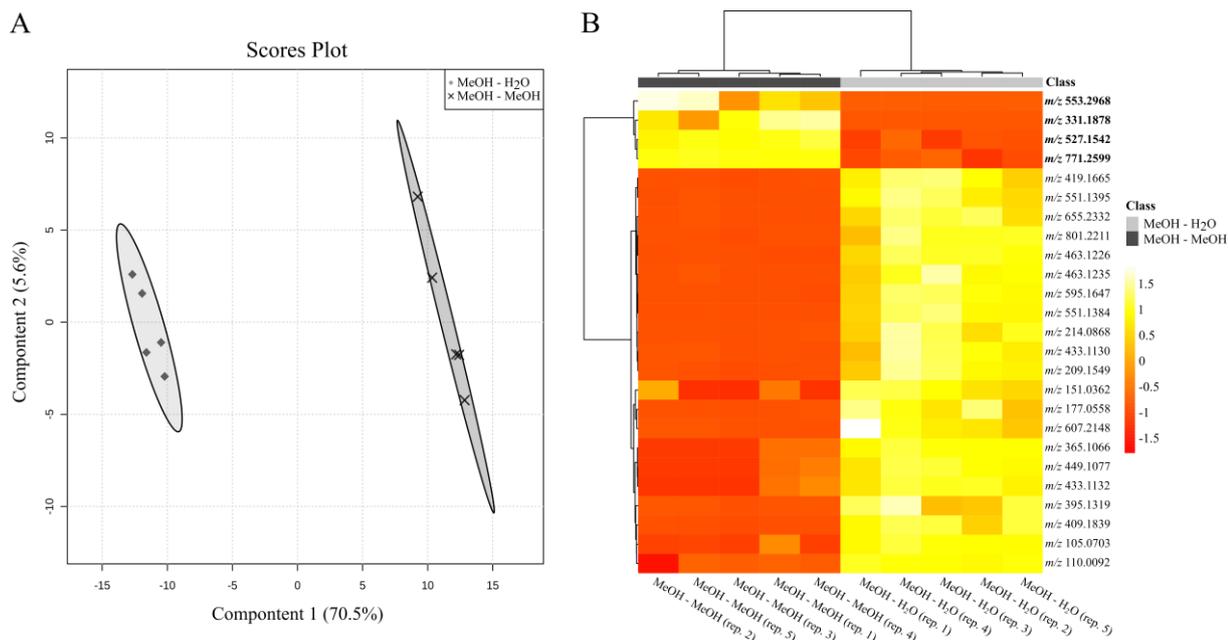


Figura 18: Análise scores plot da PLS-DA dos extratos MeOH Água e metanólico de ponteiro de cana-de-açúcar, com os dois primeiros componentes explicando 76,1% da variância (regiões com 95% de significância são mostradas) (A). Gráfico de heatmap das repetições dos extratos de ponteiro de cana-de-açúcar (B).

A análise PLS-DA apresentou nos três primeiros componentes um R^2 de 0,99 e um Q^2 de 0,96, mostrando uma confiabilidade da validação do modelo e explicando toda a variabilidade dos dados.

O heatmap (gráfico de calor) apresenta as 5 repetições dos dois tipos de extratos de ponteiro de cana-de-açúcar na coluna e as relações massa /carga (m/z) nas linhas. As ordenações das colunas e linhas acontecem perante a similaridade entre uma repetição e outra e entre relações massa/carga, respectivamente. Ainda, a cor amarelo-clara expressa maior quantidade do íon, enquanto a cor vermelha expressou menor quantidade do íon em cada repetição nos dois extratos. Assim, foi possível observar os íons de m/z . 553,2968; m/z . 331,1878; m/z . 527,1542 e m/z . 771,2599 tem maior representatividade nas repetições dos extratos metanólicos em relação aos extratos MeOH Água. Portanto, esses íons podem ser os compostos presentes no extrato metanólico que isoladamente ou em conjunto apresentaram ação fungistática contra o *F. verticillioides* e o *C. falcatum*, no ensaio biológico de inibição dos fungos.

Futuros ensaios de isolamento de compostos do extrato de ponteiro de cana-de-açúcar podem ser realizados para determinar a ação desses flavonóides contra os fungos do complexo broca-podridão. Ainda, para gerar um produto industrial é importante a realização de ensaios de aplicabilidade do produto em mudas pré-brotadas ou em canaviais já instalados.

5. CONCLUSÃO

A qualidade da cana-de-açúcar é altamente influenciada pelo complexo broca-podridão. Colmos de cana-de-açúcar com a presença do complexo broca-podridão apresentaram, reduções de sacarose, aumento de açúcares redutores, menor pureza e menor ATR em relação aos colmos sadios. Os danos diretos e indiretos causando pela praga e pelas doenças do complexo, causam prejuízos para o produtor rural, para a indústria de processamento e para a economia do país.

O estudo da interação *in vitro* dos microrganismos não mostrou inibição de um fungo sobre o outro. No entanto, os extratos brutos de compostos de *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum falcatum* foram capazes de inibir o crescimento micelial desses mesmos fungos nos diferentes meios de cultura, indicando que devemos utilizar meios de cultura mais próximos a realidade de campo desses fitopatógenos para que os resultados sejam mais confiáveis para futuros experimentos em campo ou prospecção de produtos.

Análises estatísticas multivariadas e ferramentas *in silico* foram importantes no estudo de compostos de ação fungistática e na predição de classes químicas de compostos produzidos pelos fungos do complexo broca-podridão.

Os extratos metanólicos de ponteiro de cana-de-açúcar tem um potencial comercial no controle de fungos do complexo broca-podridão, no entanto, ensaios em casas de vegetação e em campo devem ser conduzidos para confirmar a redução nas infestações dos fungos.

As análises de redes moleculares predisseram classes químicas e compostos importantes na ação fungistática dos extratos de ponteiro de cana-de-açúcar, sendo possíveis outros estudos de isolamento de compostos e geração de novos produtos naturais.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.T.; SAHI, S.T.; HABIB, A.; AHMED, S. Laboratory evaluation of fungicides and plant extracts against different strains of *Colletotrichum falcatum* the cause of red rot of sugarcane. **Pakistan Journal of Agriculture and Science**, v.53, p.181-186, 2016.
- AGROLINK. Broca do colmo: Broca da cana (*Diatraea saccharalis*). Disponível em: https://www.agrolink.com.br/problemas/broca-do-colmo_375.html, Acesso em: 21 jan 2020.
- ALEXANDER, A.G. The Energy Cane Alternative. Amsterdam, Elsevier, 1985.
- ALMEIDA, L. C. Prejuízos bilionários causados pela broca da cana justificam novas medidas de controle. 2016. 50 anos CTC. Disponível em: <https://ctc.com.br/prejuizos-bilionarios-causados-pela-broca-da-cana-justificam-novas-medidas-de-controle/>. Acesso em: 21 jan 2020.
- ARRUDA, L. A.; LEITE, R. C.; TONQUELSK, G. V.; LEAL, A. F.; BORGES, A. S. P.; RODRIGUES, L. A. Eficiência do parasitismo de três espécies de *Trichogramma* (*T. galloi*, *T. atopovirilia* e *T. bruni*) sobre ovos da praga *Diatraea saccharalis*. **Global Science and Technology**, v. 7, n. 3, p. 67 – 75, 2014.
- BANERJEE, P. et al. Super Natural II-a database of natural products. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D935–D939, 2015.
- BANZATO, T. Podridão vermelha na cana: um novo desafio para a cultura. 2022. Disponível em: <https://agriculture.basf.com/br/pt/conteudos/cultivos-e-sementes/cana-de-acucar/podridao-vermelha-na-cana-um-novo-desafio-para-a-cultura.html> Acesso em: 23 de set de 2022.
- BECKMAN, P.M.; PAYNE, G.A. Cultural techniques and conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora zae-maydis* and lesion development in corn. **Phytopathology**, v.73, p.286-289, 1983.
- BHARADWAJ, N.; SAHU, R.K. Evaluation of some fungicides, botanicals and essential oils against the fungus *Colletotrichum falcatum* causing red rot of sugarcane. **Bioscan**, v.9, p.175–178, 2014.
- BHARDWAJ, G.; SHAH, R.; JOSHI, B.; PATEL, P. *Klebsiella pneumoniae* VRE36 as a PGPR isolated from *Saccharum officinarum* cultivar Co99004. **J. Appl. Biol. Biotechnol.**, v.5, p.47–52, 2017.
- BHARTI, Y.P.; VISHWAKARMA, S.K.; KUMAR, A.; SINGH, A.; SHARMA, M.L.; SHUKLA, D.N. Physiological and Pathological Aspects of some new isolates of *Colletotrichum falcatum* causing red rot disease in *Saccharum* spp. complex. **Acta Phytopathol. Entomol. Hung.**, v. 47, p.35–50, 2012.
- BÖCKER, S.; DÜHRKOP, K. Fragmentation trees reloaded. **Journal of Cheminformatics**, v. 8, n. 1, p. 1–26, 2016.

BRASIL. Lei n. 11.241, de 19 de setembro de 2002. Dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar e dá providências correlatas. Diário oficial, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, p. 2.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA. Coordenação Geral de Agrotóxico e Afins. Manual de procedimentos para o registro de agrotóxicos. Brasília, 2022.

BROWN, D.W.; BUTCHKO, R.A.E.; BUSMAN, M.; PROCTOR, R.H. Identification of gene clusters associated with fusaric acid, fusarin, and perithecial pigment production in *Fusarium verticillioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v.49, p.521-532, 2012.

CAMPBELL, N.A.; REECE, J.B. **Biología**. Ed. Médica Panamericana, p.160-177, 2007.

CARVALHO, F.T.; QUEIROZ, J.R.G.; TOLEDO, R.E.B. Eficácia do herbicida amicarbazone no controle de cordas-de-viola na cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.10, p.183-189, 2011.

CELOTO, M.I.B.; PAPA, M.F.S.; SACRAMENTO, L.V.S.; CELOTO, F.J. Atividade antifúngica de extratos de *Momordica charantia* L. sobre *Colletotrichum musae*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.13, 2011.

CHAMBERS, M. et al. A Cross-platform Toolkit for Mass Spectrometry and Proteomics. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 918–920, 2012.

CHONG, J. et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. v. 46, n. May, p. 486–494, 2018.

CLOSE, D.C.; MCARTHUR, C. Rethinking the role of many plant phenolics - Protection from photodamage not herbivores? **Oikos Journal**, v.1, p.166–172, 2002.

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, p.118–124, 2006.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v.8, n.4, p.60, 2021. <ISSN: 2318-6852>.

CONSECANA - CONSELHO DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Manual de Instruções**. 6 ed. Piracicaba: CONSECANA, 2015. 79 p.

COSTA, J.H.; FERNANDES, L.S.; AKIYAMA, D.Y.; FILL, T.P. Exploring the interaction between citrus flavonoids and phytopathogenic fungi through enzymatic activities. *Bioorganic Chemistry*, v.102, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104126>.

COSTA, M.L.N.; GONÇALVES, D.S.F.; MACHADO, J.C. Controle de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho com óleo essencial de gengibre. **Summa Phytopathologica**, v.46, n.3, p.250-254, 2020.

COSTA, M.M.; SILVA, B.A.A.S.; MOREIRA, G.M.; PFENNING L.H. *Colletotrichum falcatum* and *Fusarium* species induce symptoms of red rot in sugarcane in Brazil. **Plant Pathology**, 2021;00:1–12. Doi: <10.1111/ppa.13423>

COTORAS, M.; GARCIA, C.; LAGOS, C.; FOLCH, C.; MENDOZA, L. Antifungal activity on *Botrytis cinerea* of flavonoids and diterpenoids isolated from the surface of *Pseudognaphalium* spp. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v.46, p.433-440, 2001.

DA SILVA, R. R. et al. Propagating annotations of molecular network using *in silico* fragmentation. **PLoS Computational Biology**, v. 14, n. 4, p. 1–26, 2018.

DAVIS, R.M.; COLYER, P.D.; ROTHROCK, C.S.; KOCHMAN, J.K. *Fusarium* wilt of cotton: population diversity and implications for management. **Plant Disease**, v.90, p. 187-193, 2006.

DEAN, R.; VAN KAN, J.A.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; FOSTER, G.D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.13, n.4, p.414-430, 2012.

DEMARTELAERE, A.C.F.; PRESTON, H.A.F.; MATA, T.C.; COSTA, W.P.L.B.; NICOLINI, C.; GOMES, W.A.; MEDEIROS, D.C.; SILVA, T.P.P.; SOUZA, J.B.; PAIVA, L.L.; MEDEIROS, P.L.; CANDIDO, D.; MONTE, F.D.M.; LAZZARINI, L.E.S.; CORDEIRO, K.A.S. Utilização de extratos no controle da antracnose em pós-colheita de *Mangifera indica*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n.1, p. 4872-4892, 2021. < ISSN: 2525-8761>.

DESJARDINS, A.E.; PROCTOR, R.H. 2001. Biochemistry and genetics of *Fusarium* toxins. **In:** SUMMERELL, B.A. *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul, p.50–69.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Pragas. **In:** DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Ed.). Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p.349-404.

DINARDO-MIRANDA, L.L., VASCONCELOS, A.C.M.D., LANDELL, M.G.D.A. Cana-de-açúcar. **Agrônômico I**, p.394-404, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FRACASSO, J.V.; COSTA, V.P.; ANJOS, I.A.; LOPES, D.O.P. Reaction of sugarcane cultivars to sugarcane borer. **Bragantia**, v. 72 p. 29-34, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052013005000012>

DJOUMBOU FEUNANG, Y. et al. ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. **Journal of Cheminformatics**, v. 8, n. 1, p. 1–20, 2016.

DÜHRKOP, K. et al. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. **Nature Methods**, v. 16, n. 4, p. 299–302, 2019.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária. 2019. Extratos de plantas são eficazes no controle de lagartas. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/41194464/extratos-de-plantas-sao-eficazes-no-controle-de-lagartas> > Acesso em: 25 jul 2021.

ERNST, M. et al. Molnetenhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. **Metabolites**, v. 9, n. 7, 2019.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2019. Crop Production, Yield, Harvested Area (Global - National - Annual - FAOSTAT). Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 17 fev. 2021. **FAO**.

FENG, S.; LUO, Z.; ZHANG, Y.; ZHONG, Z.; LU, B. Phytochemical contents and antioxidant capacities of different parts of two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars. **Food Chemistry**, v.151, p.452–458, 2014.

FRANCO, F.P.; TÚLER, A.C.; GALLAN, D.Z.; GONÇALVES, F.G.; FAVARIS, A.P.; PEÑAFLO, M.F.G.V.; LEAL, W.S.; MOURA, D.S.; BENTO, J.M.S.; SILVA-FILHO, M.C. Fungal phytopathogen modulates plant and insect responses to promote its dissemination. **The ISME Journal**, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01010-z>

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; FILHO, E.B.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba, ed. Agronômica Ceres. v.10, 920p. 2002.

GAO, Y.Q.; DU, S.T.; XIAO, J.; WANG, C.; HAN, W.B.; ZHANG, Q.; GAO, J.M. Isolation and characterization of antifungal metabolites from the *Melia azedarach* - associated fungus *Diaporthe eucalyptorum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, p. 2419-2425, 2020.

GHAZANFAR, M.U.; KAMRAN, S. Evaluation of different plant extracts against *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane under lab conditions. **Journal of Environment and Agriculture**, v.1, p.68–73, 2016.

GOMES, A.K.C.; GOMES, A.C.C.; KUSTER, R.M.; SIMAS, N.K. 2020. Evaluation of phytotoxic activity, antioxidant and phytochemical study of *Saccharum officinarum* L. Disponível em: <https://proceedings.science/bcnp-series/bcnp/papers/evaluation-of-phytotoxic-activity--antioxidant-and-phytochemical-study-of-saccharum-officinarum-?lang=en> Acesso em 27 set 2022.

HASSAN, M.N.; AFGHAN, S.; HAFEEZ, F.Y. Biological suppression of sugarcane red rot by *Bacillus* spp. under field conditions. **Journal of Plant Pathology**, v.94, p.325–329, 2012.

HIBBETT, D.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, O.E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P.M.; LÜCKING, R.; THORSTEN, L.H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P.B.; MCLAUGHLIN, D.J.; POWELL, M.J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W.; STALPERS, J.A.; VILGALYS, R.; AIME, M.C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.L.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P.W.; DAI, Y.C.; GAMS, W.; GEISER, D.M.; GRIFFITH, G.W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D.L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R.A.; HYDE, K.D.; IRONSIDE, J.E.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C.P.; LARSSON, K.H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J.M.; MOZLEYSTANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASTO, E.; REEB, V.; ROGERS, J.D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J.P.; SCHÜSSLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W.A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M.M.; WINKA, K.; YAO, Y.J.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v.111, p.509, 2007.

HIGLEY, L. G. Yield loss and pest management. In: PETERSON, R. K. D.; HIGLEY, L. G. (Ed.). Biotic stress and yield loss. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 13-22.

HOSSAIN, M.I.; AHMAD, K.; SIDDIQUI, Y.; SAAD, N.; RAHMAN, Z.; HARUNA, A.O.; BEJO, S.K. Current and prospective strategies on detecting and managing *Colletotrichum falcatum* causing red rot of sugarcane. **Agronomy**, v.10, p.1253, 2020. <doi:10.3390/agronomy10091253>

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2019. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Tabela 1618 – Área plantada, área colhida e produção, por ano da safra e produtos da lavoura. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>. Acesso em: 17 fev. 2021.

JULIATTI, F.C.; MEDEIROS, P.A.F.F.; JULIATTI, B.C.M.; JULIATTI, F.C.; FRANGIOSI, D.A.; FÁTIMA, I.G.; NETO, M.G.A.; MATOS, M.E.S.; MELO, V.N.; JESUS, M.M.N.; SILVEIRA, V.H.S. Como e quando aplicar fungicidas na cana. **Revista cultivar**. 2020. Disponível em: <https://www.grupocultivar.com.br/noticias/como-e-quando-aplicar-fungicidas-na-cana>. Acesso em 14 out 2020.

KATIYAR, D.; HEMANTARANJAN, A.; SINGH, B. Application of plant growth promoting rhizobacteria in promising agriculture: An Appraisal. **Journal of Plant Physiology and Pathology**, v.5, n.2., 2017.

KFOURY, M.; SAHRAOUI, A.L.H.; BOURDON, N.; LARUELLE, F.; FONTAINE, J.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. **Food Chemistry**, v.196. p.518-525, 2016.

KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Princípios Gerais de Controle. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. 4 ed. São Paulo: Ceres, 2011. cap. 14, p. 307-323.

LI, W.; XU, J.; LI, F.; XU, L.; LI, C. A new antifungal isocoumarin from the endophytic fungus *Trichoderma* sp. 09 of *Myoporium bontioides* A. gray. **Pharmacognosy Magazine**, v.12, p.259, 2016a.

LI, X.H.; YAN, H.; NI, W.; QIN, X.J.; ZHAO, Q.; JI, Z.Q.; LIU, H.Y. Antifungal sesquiterpenoids from *Chloranthus japonicus*. **Phytochemistry Letters**, v.15, p.199-203, 2016b.

LONG, W.H.; HENSLEY, S.D. Insect pests of sugarcane. **Annual Review of Entomology**, v.17, p.149–176, 1972.

MAIA, L.C.; CARVALHO-JUNIOR, A.A.; Introdução: os fungos do Brasil. **In...** FORZZA, R.C.; BAUMGRATZ, J.F.A.; BICUDO, C.E.M.; CARVALHO-JR., A.A.A.; COSTA, A.; COSTA, D.P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P.M.; LOHMANN, L.G.; MAIA, L.C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M.P.; COELHO, M.A.N.; PEIXOTO, A.L.; PIRANI, J.R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V.C.; STEHMANN, J.R.; SYLVESTRE, L.S.; WALTER, B.M.T.; ZAPPI, D., eds.; Andrea Jakobsson Estúdio: Rio de Janeiro, 2010.

MALATHI, P.; VISWANATHAN, R.; PADMANABAN, P.; MOHANRAJ, D.; RAMESH, A. Compatibility of biocontrol agents with fungicides against red rot disease of sugarcane. **Sugar Tech**, v.4, p.131–136, 2002.

MALATHI, P.; VISWANATHAN, R.; SUNDAR, A.R. Mechanized means of sett treatment: an effective way of delivering fungicides for the management of red rot in sugarcane. **Sugar Tech**, v.19, p.176-182, 2017.

MALATHI, P.; KAVERINATHAN, K.; SCINDIYA, M.; ELAMATHI, E.; RAMESH SUNDAR, A.; VISWANATHAN, R. *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane: genomic and proteomic approaches to characterize the pathogenic variation. **Journal of Sugarcane Research**, 2019. DOI:<[10.37580/jsr.2019.2.9.164-175](https://doi.org/10.37580/jsr.2019.2.9.164-175)>

MANOHAR, M.P.; NAYAKA, M.A.H; NAHADEVIAH. Studies on phenolic content and polyphenol oxidase activity of sugarcane varieties with reference to sugar processing. **Sugar Tech**, v. 16, p. 385–391, 2014.

MAPA. Sanidade vegetal. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-bate-recorde-de-registros-de-defensivos-agricolas-de-controle-biologico>>. Acesso em: 23 set 2022.

MARTIN, J.P.; HONG, H.L.; WISMAR, C.A. Pokkah boeng. **In:** Sugar-cane diseases of the world. vol. 1, Elsevier Publ. Co. New York 542, p.247-257, 1961.

MARTÍNEZ-MORENO, F.; JOFRE Y GARFIAS, A.E.; HERNANDEZ-ORIHUELA, A.L.; MARTÍNEZ-ANTONIO, A. Avocado seed hydrolysate as an alternative growth medium for fungi. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v.20, n.2, p.569-580, 2021.

MATSUOKA, S. Free fiber level drives resilience and hybrid vigor in energy cane. **Journal of Scientific Achievements**, v.2, p.1-35, 2017.

MEAZZA, G.; DAYAN, F.E.; WEDGE, D.E. Activity of quinones on *Colletotrichum* species. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry**. V.51, p.3824–3828, 2003.

MOHIMANI, H. et al. Dereplication of peptidic natural products through database search of mass spectra. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 1, p. 30–37, 2017.

MORAIS, M.S.; ARAÚJO, E.; ARAÚJO, A.C.; BELÉM, L.F. Eficiência dos extratos de alho e agave no controle de *Fusarium oxysporum* S. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, p. 89-98, 2010.

MURRIA, S.; KAUR, N.; ARORA, A.; ARORA, N.K. Biochemical characterization of superior seedless variety of grape (*Vitis vinifera* L.) for resistance to anthracnose. **Indian Phytopathology**, v. 71 n.3, p. 399-405, 2018.

NEALE, M. The regulation of natural products as crop-protection agentes. **Pest Management Science**, v.56, p.677-680, 2000.

NENE, Y.L.; THAPLIYAL, P.N. Fungicides in plant diseases control (Ed): Oxford and IBH publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, pp. 325, 1982.

NETCHE, K. L.; RAMOS, B.P.; VIEIRA, B. A. Identificação de doenças fúngicas foliares emergentes em cana-de-açúcar. Embrapa Meio Ambiente. Comunicado Técnico, Jaguariúna, SP, v. 53, 2016, 5p.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v,75, p.311, 2012.

NILSEN, E.T.; ORCUTT, D.M. 2000. Physiology of plants under stress: Soil and biotic factors. **John Wiley & Sons**. New York.

OGUNWOLU, E.O.; REAGAN, T.E.; FLYNN, J.L.; HENSLEY, S.D. Effects of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) damage and stalk rot fungi on sugar-cane yield in Louisiana. **Crop Protection**, v.10, p.57-61, 1991.

OLIVEIRA, J.B.; BIONDO, V.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Extratos e tinturas vegetais sobre o crescimento micelial de *Corynespora cassiicola* e indução de fitoalexinas em soja. **Revista UNINGÁ Review**, v.17, n.3, p.5-10, 2014.

ORTUÑO, A.; DÍAZ, L.; ALVAREZ, N.; PORRAS, I.; GARCÍA-LIDÓN, A.; DEL RÍO, J.A. Comparative study of flavonoid and scoparone accumulation in different citrus species and their susceptibility to *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, v.125, p. 232-239, 2011. Doi: [10.1016/j.foodchem.2010.09.012](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.012)

PANNUTI, L. E. R.; BALDIN, E. L. L.; GAVA, G. J. C.; KOLLN, O. T.; CRUZ, J. C. S. Danos do complexo broca-podridão à produtividade e à qualidade da cana-de-açúcar fertirrigada com doses de nitrogênio. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 48, n. 4, p. 381-387, 2013.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S., BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores**. São Paulo: Manole, 2002. 586p.

PARRY, W. The incidence of *Fusarium* spp. in stem bases of selected crops of winter wheat in the Midlands, UK. **Plant Pathology**, v.39 p.619-622, 1990.

PASCHOLATI, S.F.; DALIO, R.J.D. Fisiologia do Parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J.A.M. Manual de Fitopatologia Volume I: Princípios e Conceitos. 5ª ed., Agronômica Ceres, p. 424-450, 2018.

PATEL, P.; SHAH, R.; JOSHI, B.; RAMAR, K.; NATARAJAN, A. Molecular identification and biocontrol activity of sugarcane rhizosphere bacteria against red rot pathogen *Colletotrichum falcatum*. **Biotechnology Reports**, v.21, e00317, 2019.

PETERSON, R.K.D.; DANIELSON, S.D; HIGLEY, L.G. 1993. Yield responses of alfalfa to simulated alfalfa weevil injury and development of economic injury levels. **Agronomy Journal** 85:595–601. doi:10.2134/agronj1993.00021962008500030014x

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPEZ, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, p.45-61, 2002.

PLUSKAL, T. et al. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, 2010.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: A software environment for integrated models. **Genome Research**, v. 13, p. 2498–2504, 2003.

PRAGAS da cana-de-açúcar. 2017. Arquivo de aula. 132 slides. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3389795/mod_resource/content/0/Aula%20Cana-de-a%C3%A7%C3%BAcar%20_2017.pdf. Acesso em: 22 jan 2020.

PRECETTI, A. A. C. M.; TERÁN, F. O.; SANCHEZ, A. G. Alterações nas características tecnológicas de algumas variedades de cana-de-açúcar, devido ao dano da broca *Diatraea saccharalis*. **Boletim Técnico Copersucar**, v. 40, p.3-8, 1988.

RAID, R.N.; ROTT, P. Sugarcane red rot disease. In: SANDHU, H.S. (Ed.). Florida sugarcane handbook. Gainesville: University of Florida, 2015. p. 1–3.

RAIZEN – Times de sustentabilidade e comunicação corporativa da RAIZEN. Cana-de-açúcar: tudo sobre sua importância e versatilidade. 2021. Disponível em: <<https://www.raizen.com.br/blog/cana-de-acucar#:~:text=Al%C3%A9m%20do%20a%C3%A7%C3%BAcar%2C%20a%20cana,partir%20do%20baga%C3%A7o%20da%20cana.>> Acesso em: 20 jun 2022.

RAO, M.J.; DUAN, M.; YANG, M.; LI, M.; WANG, L. Sugarcane rind secondary metabolites and their antioxidante activities in eleven cultivated sugarcane varieties. **Sugar Tech**, v.24, p.1570–1582, 2022.

ROSSATO, J.A.S.; COSTA, G.H.G.; MADALENO, L.L.; MUTTON, M.J.R.; HIGLEY, L.G.; FERNANDES, O.A. Characterization and impact of the sugarcane borer on sugarcane yield and quality. **Agronomy Journal**, v. 105, issue 3, 2013.

ROSSATO JR, J.A.S.; MADALENO, L.L.; MUTTON, M.J.R.; HIGLEY, L.G.; FERNANDES, O.A. Photosynthesis, yield and raw material quality of sugarcane injured by multiple pests. **PeerJ**, 7 :e6166, 2019. Doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.6166>
RUINARD, J. Nature and assessment of losses caused by sugarcane borers. **Entomophaga**, v.16, p.175-183, 1971.

SALAH, K.B.H.; TAHRANI, L.; ALAMOUDI, S.; AL-QUWAIE, D.A.H.; HARZALLAH-SKHIRI, F.; AOUNI, M. *In vitro* antibacterial, antidermatophyte and anticandida potentials of different organic extracts and total alkaloids of Indian thorn apple (*Datura metel* L.) from Tunisia. **Applied Ecology and Environmental Research**, v.20, p.1585-1598, 2022.

SANDHU, H.S.; SINGH, M.P.; GILBERT, R.A.; ODERO, D.C. Sugarcane Botany: A Brief View... **In:** Florida Sugarcane Handbook. 2019. Disponível em: <https://edis.ifas.ufl.edu/sc034>. Acesso em: 17 fev. 2021.

SANTEN, J. et al. The Natural Products Atlas: An Open Access Knowledge Base for Microbial Natural Products Discovery. **ACS Central Science**, n. November, p. acscentsci.9b00806, 2019.

SANTIAGO, A. D.; ROSSETTO, R. Doenças fúngicas. Agência Embrapa de informação tecnológica. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_79_22122006154841.html. Acesso em: ago de 2018.

SANTOS, C.H.C.; CARVALHO, M.G.; FRANKE, K.; WESSJOHANN, L. Dammarane-type triterpenoids from the stem of *Ziziphus glaziovii* Warm. (Rhamnaceae). **Phytochemistry**, v.162, p.250-259, 2019.

SHARMA, S.; UPPAL, S.K. Occurrence of insect pests of sugarcane and their natural enemies in relation with weather parameters and effect on cane quality. **International Sugar Journal**, v.117, p.744-751, 2015.

SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fiorinae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. **Fungal Divers.**, v.39, e122, 2009.

SILVA-FILHO, M. C.; FALCO, M. C. Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinase produzidos pelas plantas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, p. 38-42, 2000.

SIMON, E.D.T.; VERÍSIMO, M.A.A.; HÄRTER, A.; UENO, B. Doenças da cana-de-açúcar. **In:** SILVA, S.D.A.; MONTERO, C.R.S.; SANTOS, R.C.; NAVA, D.E.; GOMES, C.B.; ALMEIDA, I.R. (Ed.). Sistema de produção de cana-de-açúcar para o Rio Grande do Sul. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2016. p. 104–112.

SINGH, J.; SOOD, S.; MUTHURAMAN, A. *In-vitro* evaluation of bioactive compounds, anti-oxidant, lipid peroxidation and lipoxygenase inhibitory potential of *Citrus karna* L. peel extract. **Journal of Food Science and Technology**, v.51, p.67–74, 2014.

SOUZA, A.E.F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L.C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.465-471, 2007.

SUBHANI, M.N.; CHAUDHRY, M.A.; KHALIQ, A.; MUHAMMAD, F. Efficacy of various fungicides against sugarcane red rot (*Colletotrichum falcatum*). **International Journal of Agriculture and Biology**, v.10, p.725-727, 2008.

SVEDESE, V.M. **Processo de infecção de *Beauveria bassiana* sobre a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)**. 2012. Tese (Doutora em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

SYNGENTA. Melhore o manejo da broca da cana-de-açúcar. 2019. Disponível em: <https://www.portalsyngenta.com.br/noticias-do-campo/broca-cana-manejo-produtividade-ampligo>. Acesso em: 22 jan 2020.

SYNGENTA. Cana-de-açúcar: quanto a cultura perde por causa das doenças? 2020. Disponível em: <https://portalsyngenta.com.br/noticias/cana-de-acucar-quanto-a-cultura-perde-por-causa-das-doencas>. Acesso em: 20 abr 2021. Esses dados foram pegos no site da Embrapa.

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**. V.31, p.1807, 2008.

THANGAMANIL, P.R.; THIRUVENGADAM, R.; THILLAIGOVINDAN, K. Morphological characterization and reaction of partial purified toxin of sugarcane red rot pathogen *Colletotrichum falcatum* collected from Southern India. **Int. J. Agric. Sci.** v.3, p.60-78, 2013.

TINOCO, M.L.P. **Silenciamento trans-específico in vivo entre fumo e o fungo fitopatogenico *Fusarium verticillioides***. 2010. Tese (Doutora em Biologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN-FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1997. cap. 19, p. 207-225.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Introducción a la Microbiología**. Ed. Médica Panamericana, p.187-198, 2007.

UPPALA, S.S.; ZHOU, X.G.; LIU, B.; WU, M. Plant-based culture media for improved growth and sporulation of *Cercospora jansseana*. **Plant disease**, v.103, p.504-508, 2019.

VALE, D.W.; PRADO, R.M.; AVALHÃES, C.C.; HOJO, R.H. Omissão de macronutrientes na nutrição e no crescimento da cana-de-açúcar cultivado em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, p. 189-196, 2011. DOI: 10.5039/agraria.v6i2a550.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Red rot disease in sugarcane: Challenges and prospects. **Madras Agricultural Journal**, v.87, p.549-559, 2000.

VISWANATHAN, R.; PADMANABAN, P.; SELVAKUMAR, R. Emergence of new pathogenic variants in *Colletotrichum falcatum*, stalk infecting ascomycete in sugarcane: role of host varieties. **Sugar Tech**, v.22, p.473–484, 2019.

WALLER, G. R. Introduction. **In:** MACIAS, F. A.; GALINDO, J. C. G.; MOLINILLO, J. M. G.; CUTLER, H. G. Recent advances in allelopathy. Cadiz, Serv. Pub. Univ. Cadiz, v. 1, 1999.

WALTERS, D.; RAYNOR, L.; MITCHELL, A.; WALKER, R.; WALKER, K. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. **Mycopathologia**, v.157, p.87-90, 2004.

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

WANG, Z.P.; LIU, L.; DENG, Y.C.; LI, Y.J.; ZHANG, G.M.; LIN, S.H.; HE, T.G. Establishing a forecast mathematical model of sugarcane yield and Brix reduction based on the extent of pokkah boeng disease. **Sugar Technol** v.19, p.656–661, 2017.

WEBB, K.M.; BRENNER, T.; JACOBSEN, B.J. Temperature effects on the interactions of sugarbeet with *Fusarium* yellows caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. betae. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.37, p.353-362, 2015.

WENZEL, I.M.; GIOMETTI, F.H.C.; ALMEIDA, J.E.M. Patogenicidade do isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, p.259-261, 2006.

WHITTLE, P.; IRAWAN, L. Pokkah boeng. **In:** Rott P, Bailey RA, Comstock JC, Croft BJ, Saumtally AS (eds) A guide to sugarcane diseases. CIRAD/ISSCT, La Librairie du Cirad, Montpellier, pp 136–140, 2000.

WIEDENFELD, B.; ENCISO, J. Sugarcane responses to irrigation and nitrogen in semiarid South Texas. **Agronomy Journal**, v.100, p.665-671, 2008. DOI: 10.2134/agronj2007.0286.

WIGGINS, N.L.; FORRISTER, D.L.; ENDARA, M.J.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A. Quantitative and qualitative shifts in defensive metabolites define chemical defense investment during leaf development in *Inga*, a genus of tropical trees. **Ecology and evolution**, v.6, n.2, p. 478-492, 2016.

WILSON, B.E.; SALGADO, L.D.; VILLEGAS, J.M. Optimizing chemical control for *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane. **Crop Protection**, v.152, 2022.

XU, W.; WEI, L.; QU, W.; LIANG, Z.H.; WANG, J.A.; X. PENG, X.L.; ZHANG, Y.A.; HUANG, K.L. A novel antifungal peptide from foxtail Millet seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p.1630–1637, 2011.

YADAV, R.L.; SINGH, S.N.; SRIVASTAVA, R.J.; LAL, S.K.; AWASTHI JOSHI, B.B. Use of *Trichoderma harzium* for the control of red rot disease of sugarcane. **Sugarcane Int.**, v.26, p.28–33, 2008.

YARABRASIL. **Princípios Agronômicos da Cana-de-Açúcar**. Disponível em: <<http://www.yarabrasil.com.br/nutricao-plantas/culturas/cana-de-acucar/fatores-chave/principios-agronicos/>>. Acesso em: 07/06/2016.