



EFEITOS DA VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR EM MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE CERCOSPORINA POR *Cercospora aff. canescens*

Pedro de Souza Freitas **Campos**¹; Elke Simoni Dias **Vilela**²; Bernardo de Almeida **Halfeld-Vieira**³;
Kátia de Lima **Nechet**⁴

Nº 23412

Resumo – A cercosporina tem papel fundamental na infecção de patógenos do gênero *Cercospora* e pode ser usado como metabólito natural no controle de plantas daninhas. O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de concentrações de ágar no meio de cultura na produção de cercosporina por *Cercospora aff. canescens* (CMAA 1444), potencial agente de controle biológico das cordas-de-viola, importante invasora na cana-de-açúcar. O isolado foi cultivado em meio Czapek-Dox modificado com as concentrações de ágar de 16, 8, 4,2, e 1,92 g L⁻¹. Após 14 dias de incubação a 20°C, o conteúdo das placas (colônia+meio de cultura) foram coletados, peneirados e macerados. A extração foi feita misturando o conteúdo com acetato de etila, seguido de banho de ultrassom e agitação em mesa agitadora. Os extratos obtidos foram secos, pesados e analisados em cromatografia de camada delgada ($\lambda = 365$ nm) e cromatografia líquida (UV: 470nm e fluorescência: 623nm). Os resultados foram comparados com o padrão analítico de cercosporina. Em cromatografia delgada, observou-se produção de metabólitos similares aos do padrão de cercosporina para todos os extratos obtidos do cultivo em meio de cultura modificado com 16, 8, 4,2, e 1,92 g ágar L⁻¹. Em cromatografia líquida, o tempo de retenção dos metabólitos obtidos dos extratos foi similar ao padrão de cercosporina, com exceção do meio de cultura com 4g ágar L⁻¹. A maior concentração de cercosporina obtida foi de 183,1 µg/g (470 nm), e 172,2 µg/g para o tratamento contendo 8 g ágar L⁻¹.

1.

Palavras-chave: metabólitos secundários, controle biológico, mico-herbicida, *Ipomoea* spp., corda-de-viola

¹Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas, UNICAMP, Campinas-SP; campos.psf20@gmail.com

² Analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; elke.vilela@embrapa.br

³ Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; bernardo.halfeld@embrapa.br.

⁴ Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; katia.nechet@embrapa.br



Abstract – *Cercosporin has an important role on infection caused by genus Cercospora and can be used as natural metabolite on weed control. This study aimed to assess the effect of agar concentrations in culture media on cercosporin produced by Cercospora aff. canescens (CMAA 1444), a potential biocontrol agent targeting morning glories, important weeds on sugarcane. The fungal strain was grown on modified Czapek-Dox medium with agar concentrations of 16, 8, 4.2, and 1.92 g L⁻¹. Following a 14-day incubation period at 20°C, the colonies, along with the media, were collected, sieved, and macerated. The extraction process entailed mixing the contents with ethyl acetate, subjecting them to ultrasonic bath, followed by additional agitation using an orbital shaker. The resulting extracts were dried, weighed, and analyzed using thin layer chromatography ($\lambda = 365$ nm) and high-performance liquid chromatography (UV: 470nm and fluorescence: 623nm). Results were compared with a cercosporin analytical standard. Thin layer chromatography revealed the presence of metabolites resembling cercosporin in all extracts obtained from culture media containing 16, 8, 4.2, and 1.92 g L⁻¹ of agar. Liquid chromatography analysis demonstrated peak retention times similar to cercosporin for all extracts, except from culture media containing 4 g L⁻¹. Highest cercosporin concentrations were 183.1 $\mu\text{g/g}$ (470 nm), and 172.2 $\mu\text{g/g}$ (623nm) in treatment containing 8 g L⁻¹ of agar.*

Key words: secondary metabolites, biological control, mycoherbicide, *Ipomoea* spp., morning glories

1. INTRODUÇÃO

As plantas daninhas competem por água, luz, nutrientes e espaço com as culturas e em alguns casos são hospedeiras de pragas e doenças que atacam as plantas cultivadas (LORENZI, 2000). As espécies que são consideradas importantes podem interferir nos estádios iniciais e também durante o ciclo de desenvolvimento da cultura, interferindo na colheita e contribuindo para o aumento do banco de sementes (BASTIAANS et al., 2008). O principal método de controle utilizado no manejo de plantas daninhas é o uso de herbicidas químicos.

Na cultura da cana-de-açúcar, a prática da colheita mecanizada sem queima (cana-crua) permite a formação de uma cobertura de palha proveniente de folhas, bainhas, ponteiros e pedaços de colmo que são cortados, triturados e lançados sobre a superfície do solo (MONQUERO et al., 2011). Essa camada de palha no solo influencia a comunidade de plantas daninhas e seu banco de sementes (SILVA et al., 2015). Neste cenário, espécies que não dependem diretamente da luz solar



para germinar e apresentam estruturas de reservas que permitem sobrepor essa camada de palha estão se tornando mais problemáticas na cultura da cana-de-açúcar (CORREIA; KRONKA, 2010).

Dentre estas espécies, pode-se destacar as do gênero *Ipomoea* spp., conhecidas por cordas-de-viola, pertencentes à família *Convolvulaceae*, com hábito trepador e ciclo biológico longo, o que as torna importante não só pela competição imposta no início da cultura, mas também durante a colheita, pois seus ramos se fixam aos colmos (LORENZI, 2000). Como consequência da competição, há redução da produtividade da cana-de-açúcar (BHULLAR et al., 2012). Um exemplo do efeito deletério das cordas-de-viola em cana-de-açúcar pode ser ilustrado por dados referentes à interferência de *I. grandifolia* na cultura, que ocasionou a antecipação da maturação e redução em 36% do número de colmos, com queda de 46% na produtividade (SILVA et al., 2009). Um evento desta natureza pode gerar impacto econômico significativo, uma vez que o valor de açúcar total recuperável tende a ser negativamente afetado pela redução da produtividade (SILVA et al., 2009).

Particularmente na cana-de-açúcar, o controle das cordas-de-viola é dificultado pela presença da palha que interfere na eficácia de herbicidas tanto em pré-emergência (SILVA; MONQUERO, 2013) como em pós-emergência pois nem sempre é possível atingir todas as plântulas nos estádios recomendados em função do fluxo de emergência em diferentes períodos (PIZZO et al., 2010). Neste contexto, a planta foi selecionada como planta-alvo para estudos de controle biológico pelo método inundativo ou de mico-herbicida, com o uso do fungo fitopatogênico *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2019).

De forma complementar ao uso direto do patógeno como agente de controle, a busca por processos químicos e bioquímicos envolvidos na interação planta-patógeno pode aumentar a eficácia de um mico-herbicida (HUBBARD et al., 2014). Neste sentido, a exploração da fitotoxina cercosporina produzida por fungos pertencentes ao gênero *Cercospora* spp. pode ter papel relevante, uma vez que poderia aumentar a infectividade do inóculo produzido ou resultar na obtenção de metabólitos naturais de ação herbicida que podem ser utilizados diretamente no controle de plantas. Esta molécula pertence ao grupo químico das perylenequinonas e atua diretamente no processo de infecção do patógeno em plantas (DAUB, 1982).

Estudos prévios indicaram que no cultivo de *Cercospora* aff. *canescens* em fermentação líquida há a produção de mais de um metabólito secundário não identificado. Por outro lado, em fermentação sólida, obtém-se a produção somente do metabólito com perfil similar ao padrão analítico cercosporina, produzido por *Cercospora* aff. *canescens* (DIAS et al., 2022) sendo, portanto, considerada a condição de fermentação mais adequada para obtenção de cercosporina. Porém,



durante o processo de extração de metabólitos a partir da fermentação sólida, é necessária a trituração prévia da colônia fúngica obtida, utilizando peneira para posterior maceração em cadinho, processo que é dificultado com a presença do meio de cultura solidificado. Como forma de contornar esta limitação, uma alternativa seria reduzir ao máximo possível a concentração de ágar no meio de cultivo. Porém não há informação se a redução do ágar pode influenciar a produção do metabólito secundário cercosporina pelo fungo nestas condições.

Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência da concentração de ágar em meio de cultura na produção de cercosporina de *Cercospora* aff. *canescens*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O isolado de *Cercospora* aff. *canescens* (CMAA 1444) foi recuperado da preservação pelo método Castellani (CASTELLANI, 1967) e repicado para placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA). As placas foram mantidas em incubadora tipo BOD a 25°C com luz contínua por 7 dias. Após este período, quatro discos de 5mm de diâmetro do meio contendo a colônia fúngica foram transferidos para uma placa de Petri contendo 20 mL do meio sintético Czapek-Dox modificado, pH 7, previamente selecionado para a produção de metabólito secundário do fungo (Tabela 1). Os tratamentos corresponderam às variações de ágar adicionados ao meio de cultura: T1: 16 g L⁻¹, T2: 8 g L⁻¹, T3: 4,2 g L⁻¹ e T4: 1,92 g L⁻¹. Para cada tratamento foram utilizadas 5 placas de Petri.

Tabela 1. Composição do meio sintético Czapek-Dox modificado utilizado para a produção de metabólito secundário de *Cercospora* aff. *canescens* (CMAA 1444)

Composto	% (m/v)
Dextrose	2,25
Nitrato de cálcio tetrahidratado	0,1
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,1
Fosfato de potássio	0,1
Cloreto de potássio	0,05
Sulfato ferroso heptahidratado	0,0067



Após a repicagem, as placas permaneceram em incubadora do tipo BOD a 25°C por 14 dias. Após este período, foi feita a maceração da colônia obtida, retirando-se todo o conteúdo da placa juntamente com o meio de cultura, com auxílio de espátulas, que foi transferido para peneiras e pressionado para realizar uma trituração prévia. Em seguida, a colônia triturada foi transferida para cadinho e macerada com auxílio de pistilo. Os produtos macerados foram transferidos para Erlenmeyers de 250mL contendo 30mL do solvente acetato de etila, colocados em ultrassom por 5 minutos e, posteriormente, em agitação em mesa rotatória por 30 minutos, a 150 rpm. Em seguida, foi adicionado sulfato de sódio aos extratos e estes foram filtrados em papel filtro Whatman nº1. A fração sólida retida no filtro foi, então, submetida a mais dois processos de extração com 30mL de solvente e 15 minutos de rotação em mesa rotatória.

Os extratos filtrados obtidos foram acondicionados em balões de fundo redondo e concentrados em rotaevaporador (35°C/ 190mbar/ 80rpm). Após este processo, os extratos foram transferidos para frascos com pesos previamente conhecidos e secos com jato de nitrogênio.

Os extratos secos foram diluídos em 0,5ml de metanol, com solubilização auxiliada por banho de ultrassom, e uma alíquota foi coletada com capilares de vidro para análise de cromatografia de camada delgada (CCD). Em seguida, adicionou-se 1ml de acetonitrila às amostras para submetê-las a cromatografia líquida (HPLC).

Na análise de CCD, os extratos foram aplicados em cromatofolhas de alumínio (Modelo DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄), submersas em uma combinação de clorofórmio, etanol e água. Como controle negativo utilizou-se o solvente acetato de etila e como controle positivo utilizou-se o padrão analítico de cercosporina (Cercosporin from *Cercospora hayii*- Sigma® C6696). O resultado da produção ou não de cercosporina foi visualizado através de exposição das cromatofolhas à uma lâmpada ultravioleta, usando $\lambda = 365$ nm de comprimento de onda, utilizando a Câmara de UV para visualização de fluorescência 264/395 nm. A produção de cercosporina foi confirmada pela visualização de padrão coincidente ao padrão analítico de cercosporina comercial.

Para a cromatografia líquida, estabeleceu-se uma curva padrão com diferentes concentrações do padrão analítico. As amostras, então, foram purificadas com solventes e para obtenção de curvas de absorvâncias por cromatografia líquida (HPLC) utilizando uma coluna C18 (150 mm x 4,6 mm) com partículas de 5 mm tamanho, mantido a $30 \pm 0,5$ ° C (GUNASINGHE et al., 2016; PERRY; GREEN, 1984). Após injeção do padrão analítico de cercosporina, estabeleceu-se um tempo de retenção padrão para a cercosporina. Com este dado, foi possível identificar graficamente os compostos presentes nas amostras com tempo de retenção similares. Os valores de área e tempo

foram relacionados com a curva padrão, o que gerou as concentrações obtidas. A partir dos dados de tempo de retenção (UV e fluorescência), a área do pico e a massa dos extratos secos, obteve-se a quantificação de cercosporina ($\mu\text{g/g}$) em cada tratamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de cercosporina a partir da extração de metabólitos produzidos por *Cercospora* aff. *canescens* cultivado em meio sintético sólido Czapek-Dox modificado com diferentes concentrações de ágar é apresentada na figura 1.

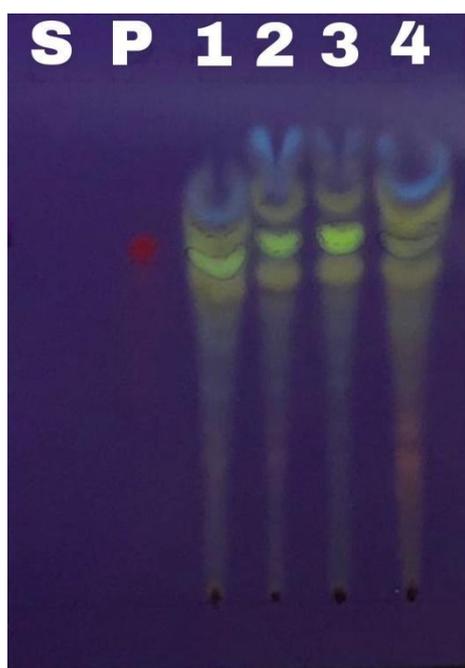


Figura 1. Análise de cromatografia em camada delgada dos extratos obtidos do meio sólido Czapek-Dox nas concentrações de ágar de 16g L^{-1} (1), 8g L^{-1} (2), $4,2\text{g L}^{-1}$ (3) e $1,92\text{g L}^{-1}$ (4) após 21 dias de cultivo de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444. Controle negativo- solvente (S) e controle positivo – padrão analítico de cercosporina (P).

Os metabólitos produzidos nos tratamentos 1 (16g de ágar L^{-1}), 2 (8g de ágar L^{-1}) e 3 ($4,2\text{g}$ de ágar L^{-1}) apresentaram similaridade com o padrão analítico de cercosporina (*Cercosporina* de *Cercospora hayii*- Sigma-C6696-5 mg). Porém, o tratamento 1 aparentemente indicou a produção também de outro composto não identificado. O tratamento 4 ($1,92\text{g}$ de ágar L^{-1}) embora tenha

indicado a produção de metabólito similar ao padrão analítico de cercosporina, apresentou uma fração de intensidade menor quando comparada com a intensidade do padrão analítico (Figura 1).

Para confirmação da produção de metabólito similar ao padrão analítico de cercosporina visualizada em CCD, as curvas de absorbância das amostras dos tratamentos foram analisadas em HPLC e o tempo de retenção comparado com o obtido para o padrão analítico (Figuras 2 a 5).

TRATAMENTO 1 (16,0g/L)

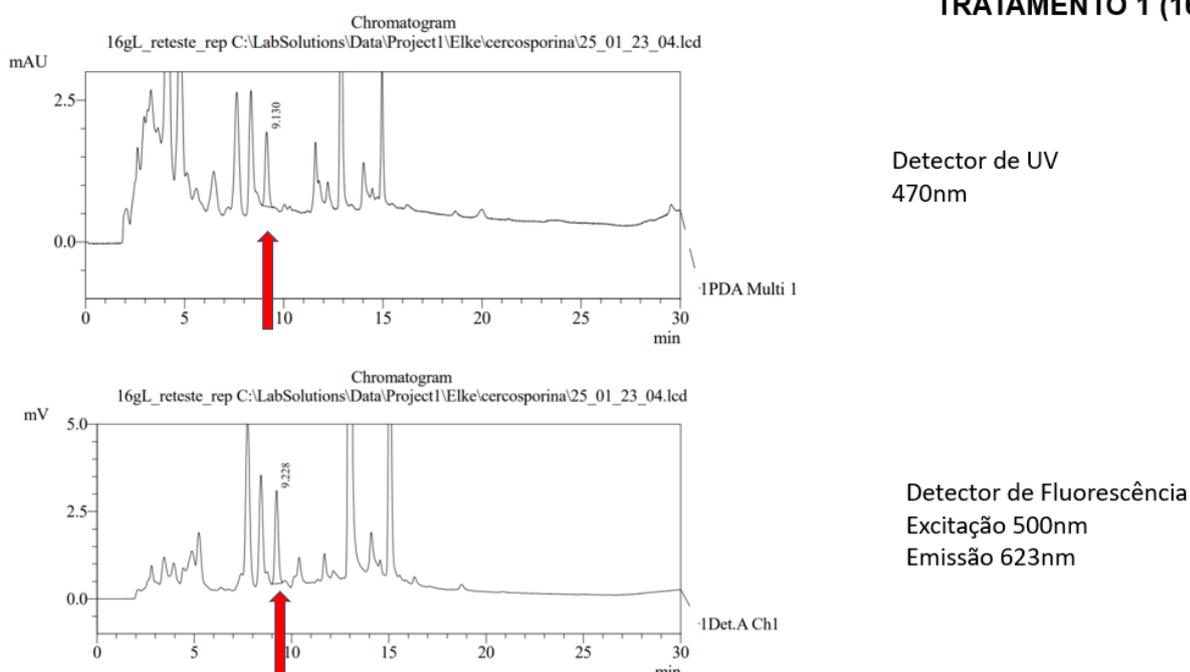
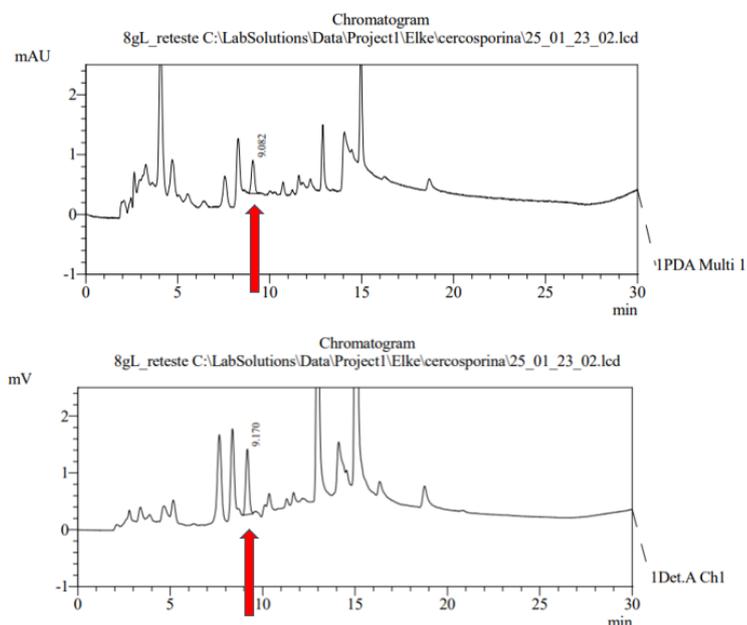


Figura 2. Cromatogramas obtidos de análise em cromatografia líquida do metabólito produzido a partir da fermentação sólida de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 em meio Czapek-Dox modificado com concentração de 16 g de ágar L⁻¹. A seta vermelha indica o pico observado para o padrão analítico de cercosporina. Detecção a 470 nm (UV) e 623nm (fluorescência).

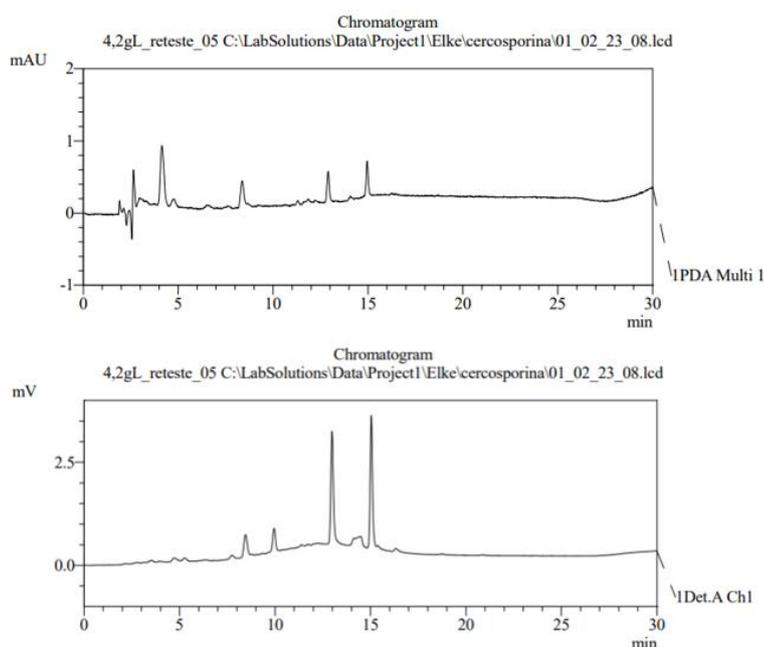


TRATAMENTO 2 (8,0g/L)

Detector de UV
470nm

Detector de Fluorescência
Excitação 500nm
Emissão 623nm

Figura 3. Cromatogramas obtidos de análise em cromatografia líquida do metabólito produzido a partir da fermentação sólida de *Cercospora aff. canescens* CMAA 1444 em meio Czapek-Dox modificado com concentração de 8 g de ágar L⁻¹. A seta vermelha indica o pico observado para o padrão analítico de cercosporina. Detecção a 470 nm (UV) e 623 nm (fluorescência).



TRATAMENTO 3 (4,2g/L)

Detector de UV
470nm

Detector de Fluorescência
Excitação 500nm
Emissão 623nm

Figura 4. Cromatogramas obtidos de análise em cromatografia líquida do metabólito produzido a partir da fermentação sólida de *Cercospora aff. canescens* CMAA 1444 em meio Czapek-Dox modificado com concentração de 4,2 g de ágar L⁻¹. Detecção a 470 nm (UV) e 623 nm (fluorescência).

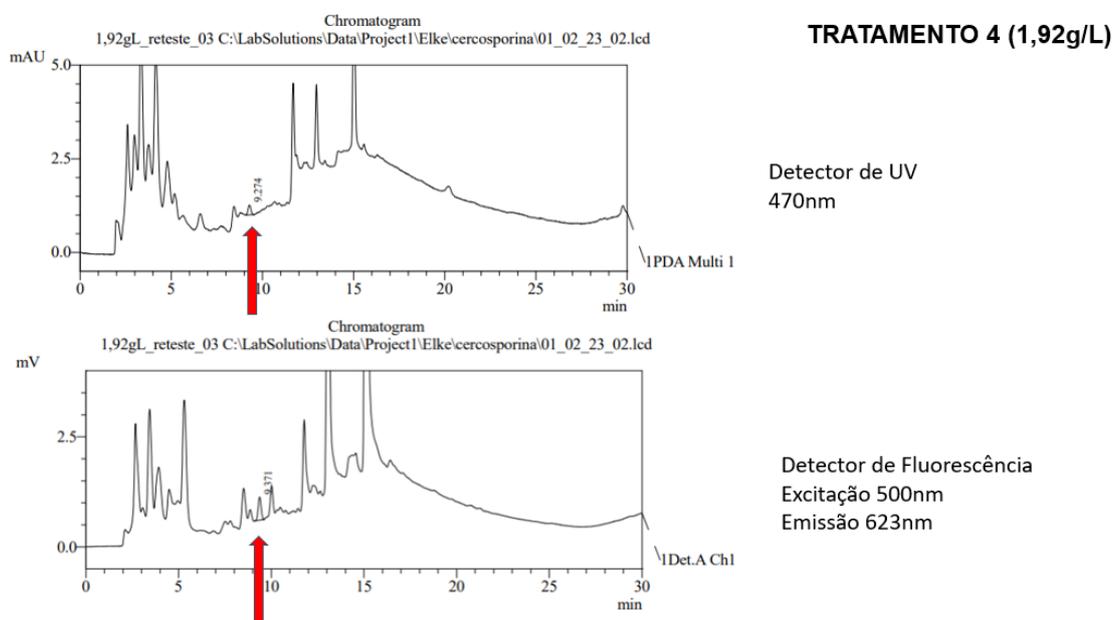


Figura 5. Cromatogramas obtidos de análise em cromatografia líquida do metabólito produzido a partir da fermentação sólida de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 em meio Czapek-Dox modificado com concentração de 1,92g de ágar L⁻¹. A seta vermelha indica o pico observado para o padrão analítico de cercosporina. Detecção a 470 nm (UV) e 623nm (fluorescência).

O tempo de retenção do padrão analítico de cercosporina foi em torno de 9 minutos. O tempo de retenção obtido para as amostras dos tratamentos 1 (16 g de ágar L⁻¹), 2 (8 g de ágar L⁻¹) e 4 (1,92 g de ágar L⁻¹) foi similar ao tempo de retenção do padrão analítico (Figuras 2,3 e 5). O tratamento 3 (4,2 g de ágar L⁻¹) não apresentou picos detectáveis similares ao padrão analítico na análise cromatográfica (Figura 4). A análise foi repetida outras vezes, mas não foi possível encontrar um gráfico com pico compatível ao do padrão de cercosporina.

As quantificações de cercosporina obtidas para cada tratamento são apresentadas na tabela 2 considerando a detecção a 470 nm e 623 nm.



Tabela 2. Quantificação de cercosporina obtida da fermentação sólida de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 em meio Czapek-Dox modificado com diferentes concentrações de ágar.

Tratamento	Concentração ($\mu\text{g/g}$)	
	UV	Fluorescência
T1 (16 g ágar/L)	14,9	14,2
T2 (8 g ágar/L)	183,1	172,2
T3 (4,2 g ágar/L)	-	-
T4 (1,92 g ágar/L)	8,2	6,4

A cercosporina foi detectada nos tratamentos 1, 2 e 4 com variações de concentração em função do tratamento. Os maiores valores foram observados para o tratamento 2 (8 g ágar L⁻¹) com produção de 183,1 $\mu\text{g/g}$ (detecção a 470 nm) e 172,2 $\mu\text{g/g}$ (detecção a 623 nm). Para o tratamento 1 (16 g de ágar L⁻¹) a produção de cercosporina foi em torno de 14 $\mu\text{g/g}$ para ambos os comprimentos de onda. Para o tratamento 4 (1,92 g de ágar L⁻¹) a produção de cercosporina foi de 8,2 $\mu\text{g/g}$ (detecção a 470 nm) e de 6,4 $\mu\text{g/g}$ (detecção a 623 nm). Não foi possível quantificar a produção de cercosporina para o tratamento 3, uma vez que não se detectou tempo de retenção similar ao padrão analítico em HPLC. Supõe-se que o metabólito produzido tenha sido degradado ou a amostra contaminada por outros compostos durante o ensaio.

Neste trabalho foi observado que a produção de cercosporina variou em função da concentração de ágar no meio de cultivo de *Cercospora* aff. *canescens*. A maior produção de cercosporina ($\mu\text{g/g}$) foi obtida com o cultivo em meio de cultura Czapek-Dox modificado com 8 g de ágar L⁻¹. A redução da concentração de ágar no meio de cultivo facilita o processo de extração do metabólito do fungo. Contudo, a eliminação do ágar na formulação do meio não é adequada, uma vez que, em meio não agarizado, há produção de outros compostos não identificados durante o cultivo de *Cercospora* aff. *canescens* (Dias et al., 2022).

Vários estudos demonstraram a influência das condições de cultivo sobre a produção de fitotoxinas por fungos fitopatogênicos. A produção de ácido fusárico por *Fusarium oxysporum* f sp. *lilii* foi influenciado pela composição do meio de cultura (LÖFFLER; MOURIS, 1992) enquanto o cultivo estacionário de *Alternaria alternata* permitiu a identificação de maiores quantidades das toxinas alternariol, alternariol metil éter e ácido tenuazônico, quando comparado ao cultivo sob agitação (BRZONKALIK et al., 2011). Para a fitoxina cercosporina, Jenns et al., 1989 verificaram que a composição do meio de cultura, a temperatura e o fotoperíodo, considerando diferentes espécies de *Cercospora*, são fatores que influenciam na sua produção. Este estudo relata pela primeira vez a



influência da concentração do ágar no meio de cultura na produção de cercosporina e futuros estudos serão conduzidas para entender de que forma ocorre esta correlação.

4. CONCLUSÃO

Há influência da concentração do ágar em meio de cultura na produção de cercosporina por *Cercospora aff. canescens*. A maior produção de cercosporina foi de 183 µg/g oriunda de amostra obtida a partir do cultivo deste fungo em meio Czapek-Dox modificado, utilizando 8 g de ágar L⁻¹. A redução do ágar no meio de cultura facilita o processo de extração de cercosporina e subsidia estudos de produção de metabólito secundário de *Cercospora aff. canescens* que podem ser utilizados no controle biológico de cordas-de-viola.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica, à Embrapa pelo apoio financeiro (10.19.02.002.00.00) e à Embrapa Meio Ambiente pela infraestrutura e apoio logístico. Kátia de Lima Nechet agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (Proc. 305187/2022-8). Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (Proc. 309014/2021-2).

6. REFERÊNCIAS

- BASTIAANS, L.; PAOLINI, R.; BAUMANN, D. T. Focus on ecological weed management: what is hindering adoption? **Weed Research**, v. 48, p. 481–491, 2008.
- BHULLAR, M. S. et al. Control of morningglories (*Ipomoea* spp.) in sugarcane (*Saccharum* spp.). **Weed Technology**, v. 26, p. 77-82, 2012.
- BRZONKALIK, K. et al. The influence of different nitrogen and carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata*. **International Journal of Food Microbiology**, v.147, p. 120-126, 2011.
- CASTELLANI, A. A maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.
- CORREIA, N.M.; KRONKA JR., B. Controle químico de plantas dos gêneros *Ipomoea* e *Merremia* em cana-soca. **Planta Daninha**, v.28, p.1143-1152, 2010.
- DAUB, M. E. Cercosporin, a photosensitized toxin from *Cercospora* species. **Phytopathology**, v.72, n.4, p. 369-371, 1982.
- DIAS, G. M. de L. et al. Avaliação de diferentes métodos de fermentação e meios de cultura na obtenção de cercosporina produzida por *Cercospora aff. canescens*. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE



INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16., 2022, Campinas. **Anais...**Campinas: Instituto Agrônomo, 2022. Evento online. CIIC 2022. Nº 22405. p. 1-12.

GUANASINGHE, N. et al. Cercosporin from *Pseudocercospora capsellae* and its critical role in white leaf spot development. *Plant Disease*, v. 100, n.8, p. 1521-1531, 2016.

HUBBARD, M. et al. The biochemistry behind biopesticide efficacy. **Sustainable Chemical Processes**, v. 2:18, 2014. Disponível em: < <http://www.sustainablechemicalprocesses.com/content/2/1/18>>. Acesso em: 08 ago. 2023.

JENNS, A. E.; DAUB, M. E.; UPCHURCH, R. G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. **Phytopathology**, v. 79, p. 213-219, 1989.

LÖFFLER, H. J. M.; MOURIS, J. R. Fusaric acid: phytotoxicity and in vitro production by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lilii*, the causal agent of basal rot in lilies. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 98, p. 107-115, 1992.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 608 p.

MONQUERO, P. A. et al. Monitoramento do banco de sementes de plantas daninhas em áreas com cana-de-açúcar colhida mecanicamente. **Planta Daninha**, v. 29, n.1, p. 107-119, 2011.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Development of *Cercospora* leaf spot on *Ipomoea* weed species for biological control. **BioControl**, v. 64, p.185-195, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10526-018-09918-w>

PERRY, R. H.; GREEN, D. W. **Perry's chemical engineers' handbook**. 6. Ed. New York: McGraw-Hill, 1984. 1846 p.

PIZZO, I. V. et al. Seletividade e eficácia de controle de plantas daninhas pela associação entre óleo fúsel e herbicidas em cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 347-357, 2010.

SILVA, I. A. B. et al. Interferência de uma comunidade de plantas daninhas com predominância de *Ipomoea hederifolia* na Cana-Soca. **Planta Daninha**, v. 27, p. 265-572, 2009.

SILVA, P. V.; MONQUERO, P. A. Influência da palha no controle químico de plantas daninhas no sistema de cana crua. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.12, n.1, p.94-103, 2013.

SILVA, P. V. et al. Influence of sugarcane straw and sowing depth on the emergence of weed species. **Planta Daninha**, v. 33, p. 405-412, 2015.