

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE
FUSARIUM, QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS E CONTROLE
DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

RENATA REGINA PEREIRA DA CONCEIÇÃO

BELO HORIZONTE – MG
2021

RENATA REGINA PEREIRA DA CONCEIÇÃO

**MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *FUSARIUM*,
QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS E CONTROLE DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff
Co-orientadoras: Dra. Valéria Aparecida Vieira Queiroz
Dra. Maria Lúcia Ferreira Simeone

Belo Horizonte – MG
2021

- 043 Conceição, Renata Regina Pereira da.
Métodos alternativos para identificação de Fusarium, quantificação de fumonisinas e controle de fungos fitopatogênicos [manuscrito] / Renata Regina Pereira da Conceição. – 2021.
129 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff. Co-orientadoras: Dra. Valéria Aparecida Vieira Queiroz; Dra. Maria Lúcia Ferreira Simeone.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Zea mays. 3. Sorghum. 4. Fusarium. 5. Micotoxinas. I. Stoianoff, Maria Aparecida de Resende. II. Queiroz, Valéria Aparecida Vieira. III. Simeone, Maria Lúcia Ferreira. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE Tese de RENATA REGINA PEREIRA DA CONCEIÇÃO
Nº REGISTRO: 2016725170

Às 14 horas do dia 30 de março de 2021, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Vera Lúcia dos Santos, Aristóteles Góes Neto, Everaldo Paulo de Medeiros, Felipe Machado Trombete e a Profa. Maria Aparecida de Resende Stoianoff-Orientadora, Dras. Valéria Aparecida Vieira Queiroz e Maria Lúcia Ferreira Simeone - Coorientadoras, para julgar o trabalho final Métodos Alternativos Para Identificação De Fusarium, Quantificação De Fumonisinas E Controle De Fungos Fitopatogênicos, da aluna **Renata Regina Pereira da Conceição**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de março de 2021. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos

Vera Lúcia dos Santos

Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto

Aristóteles Góes Neto

Prof. Dr. Everaldo Paulo de Medeiros

Everaldo Paulo de Medeiros

Prof. Dr. Felipe Machado Trombete

Felipe Machado Trombete

Profa. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff (Orientadora)

Maria Aparecida de Resende Stoianoff

Profa. Dra. Valéria Aparecida Vieira Queiroz

Valéria Aparecida Vieira Queiroz

Profa. Dra. Maria Lúcia Ferreira Simeone

Maria Lúcia Ferreira Simeone

Flávio Guimarães da Fonseca

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Federal de Minas Gerais, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e ao Laboratório de Micologia, pela oportunidade de realização deste curso;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo;

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – (Embrapa Milho e Sorgo, e Algodão), pela oportunidade da realização do projeto;

À profa. Dra. Maria Aparecida Resende-Stoianoff, meu agradecimento pela orientação, ensinamentos, dedicação e carinho de sempre, e por ter proporcionado a concretização deste trabalho;

Às Dras. Valéria Queiroz e Maria Lúcia Simeone, agradeço pela coorientação, pelos ensinamentos, pelo apoio e incentivo, pela amizade e por acreditarem no meu potencial;

A banca examinadora, pelas correções e valiosas sugestões;

Aos meus colaboradores, pelo auxílio e ensinamentos, em especial ao Dr. Everaldo de Medeiros pelo acolhimento, ensinamentos e oportunidade;

Aos amigos da Embrapa Milho e Sorgo que fizeram minha caminhada mais leve e feliz (Rafael, Cris, Michelle, Cibele, Quele, Mariana, Maria Cecília), agradeço pelo companheirismo e amizade, em especial ao Rafael pelo auxílio nas análises;

Aos amigos da Embrapa Algodão que me acolheram e me proporcionaram ótimos momentos (Bruno, Edijane, Joabson, Fábria), por todo auxílio, carinho e amizade;

Aos amigos da UFMG – Laboratório de Micologia, em especial Crísia, Paulo e Douglas, que foram fundamentais para realização deste trabalho, agradeço pela amizade, pelas palavras de apoio, paciência e parceria;

Aos meus pais e irmã, agradeço pelo amor incondicional, apoio e educação, e por serem sempre presentes;

Ao meu querido Filipe, pelo amor, incentivo e compreensão;

Aos meus amigos e familiares pela compreensão nos momentos de ausência, pelo companheirismo e incentivo;

A todos que, de alguma forma, contribuíram e foram importantes na realização deste trabalho, serei sempre grata!

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos grãos mais presentes na dieta humana e animal e possui grande importância econômica e social. Porém, essa cultura agrícola é muito suscetível ao ataque de fungos patogênicos que, além de causarem prejuízos na produção, podem produzir micotoxinas capazes de provocar graves danos à saúde. Esses patógenos e essas toxinas são de difícil controle e os métodos de detecção são bastante onerosos e demorados. Assim, a busca por métodos alternativos, de controle e de rápida detecção e identificação de fungos e de micotoxinas é de grande relevância. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos utilizar a tecnologia de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo e técnicas de análise multivariada de imagens para desenvolver um método para classificação de fungos do gênero *Fusarium*, quantificação de fumonisinas, bem como analisar a atividade antifúngica de compostos fenólicos obtidos de grãos de sorgo sobre o desenvolvimento de espécies fitopatogênicas. Foi implementado o uso de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo (HSI-NIR) combinadas com a análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) de imagens, afim de desenvolver um método rápido para identificação de *Fusarium verticillioides* e *F. graminearum*. A validação foi realizada com 15 isolados de *Fusarium* spp. A técnica de HSI-NIR foi capaz de realizar a identificação e distinção dos fungos *F. verticillioides* e *F. graminearum*. Para quantificar o teor de fumonisinas totais (B1 + B2) em grãos de milho foi utilizado os espectros médios obtidos a partir da técnica HSI-NIR com regressão multivariada e, de um total de 51 amostras. O método CLAE foi utilizado para a obtenção dos resultados de referência. Após o pré-processamento dos dados, o modelo final utilizando os espectros médios de imagens HSI-NIR apresentou, para o conjunto de calibração, R^2 de 0,96 e RMSEC 822,45 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; e R^2 de 0,94 e RMSEP de 890,35 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para o conjunto de amostras utilizadas na validação externa. A relação de desempenho do desvio (RPD) para o modelo foi de 4,9. Foi avaliado o efeito antifúngico do extrato fenólico de sorgo SC319 (1330 mg GAE.g⁻¹) sobre espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Stenocarpella*, *Colletotrichum* e *Macrophomina*, por meio das análises de CIM, taxa de germinação e curva de crescimento. Para a análise de CIM todas as amostras apresentaram crescimento acima da concentração máxima

testada ($5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), ao contrário de que se esperava houve efeito positivo, ou seja, maiores taxas de germinação na presença do extrato fenólico para o percentual de conídios germinados em 4 das 14 amostras, e na curva de crescimento foi possível observar que o controle apresentou maior contagem de UFC's do que as amostras com EFS. Não foi evidenciado efeito antifúngico do extrato fenólico de sorgo sobre espécies toxigênicas que acometem o milho. Entretanto, sugere-se outros testes com diferentes cultivares de sorgo a fim de avaliar o efeito antifúngico desse extrato.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; Fungos toxigênicos; *Sorghum bicolor* L. Moench; HSI-NIR.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most common grains in the human and animal diet and has great economic and social importance. However, this agricultural crop is very susceptible to attack by pathogenic fungi that, in addition to causing losses in production, can produce mycotoxins capable of causing serious damage to health. These pathogens and toxins are difficult to control and detection methods are quite expensive and time-consuming. Thus, a search for alternative methods of control and rapid detection and identification of fungi and mycotoxins is highly demonstrated. Thus, the present work aimed to use hyperspectral imaging technology in the near infrared and multivariate image analysis techniques to develop a method for classifying *Fusarium* fungi, quantifying fumonisins, as well as analyzing an antifungal activity of phenolic compounds result of sorghum grains on the development of phytopathogenic species. The use of hyperspectral images in the near infrared (HSI-NIR) combined with pattern recognition analysis, discriminant analysis of partial complements (PLS-DA) of images in order to develop a rapid method for the identification of *Fusarium verticillioides* and *F. graminearum*. The validation was performed with 15 granted by *Fusarium* spp. The HSI-NIR technique was able to identify and distinguish fungi *F. verticillioides* and *F. graminearum*. To quantify the content of total fumonisins (B1 + B2) in maize grains, the medium spectra obtained from the HSI-NIR technique with multivariate regression were used, and a total of 51 ed. The CLAE method was used to obtain the reference results. After the pre-processing of the data, the final model using the medium spectra of HSI-NIR images presents, for the calibration set, R^2 of 0.96 and RMSEC 822.45 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; and R^2 of 0.94 and RMSEP of 890.35 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for the set of users used in external validation. The deviation performance ratio (RPD) for the 4.9 model. The antifungal effect of the phenolic extract of sorghum SC319 (1330 mg GAE.g⁻¹) on species of the genera *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Stenocarpella*, *Colletotrichum* and *Macrophomina* was evaluated, by means of MIC analysis, germination rate and growth curve. For the MIC analysis, all samples showed growth above the maximum tested concentration (5000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), contrary to what was expected, there was a positive effect, that is, higher germination rates in the presence of the phenolic extract for the percentage of germinated conidia. in 4 of the 14 samples, and in the growth curve it

was possible to observe that the control had a higher count of CFU's than the samples with EFS. There was no evidence of an antifungal effect of phenolic sorghum extract on toxigenic species that affect corn. However, other tests with different sorghum cultivars are suggested in order to evaluate the antifungal effect of this extract.

Keywords: *Zea mays* L.; Toxigenic fungi; *Sorghum bicolor* L. Moench; HSI-NIR.

Lista de Figuras

- Figura 1: 1.1 *Fusarium verticillioides* em microscopia eletrônica. (a) Monofíalides com cadeias de conídios; (b-d) conidióforos e microconídios; (e-g) macroconídios. 1.2 *Fusarium graminearum* na superfície abaxial de glumas de trigo. (a-b) e (e-f) microscopia eletrônica de varredura: a) microconídio germinando e b) hifas em contato com um estoma; e) hifas subcuticulares sob hifas mais finas crescendo acima da superfície cuticular; f) macroconídio em um conidiósporo; (c-d) micrografias de campo claro de superfícies abaxiais em amostras coradas com algodão-bluelactofenol: hifas espessadas e ramificadas..... 28
- Figura 2: Sistema tridimensional de cubos de dados. a) Uma HSI – NIR é um cubo de dados que consiste em duas dimensões espaciais (X e Y) e uma espectral (λ), onde cada pixel no intervalo da amostra pode ser representado como (b) espectros da região NIR do espectro eletromagnético; c) Os espectros podem ser representados como espectros médios de um objeto na imagem..... 36
- Figura 3: Etapas do processamento de imagem do HSI-NIR. a) Aquisição de imagem multivariada; b) Pré-processamento dos dados; c) Análise da imagem; d) Predição da amostra..... 37
- Figura 4: Imagens fotográficas das colônias dos isolados de *Fusarium verticillioides* e *F. graminearum*, após 3 dias de crescimento..... 55
- Figura 5: Equações para cálculo dos parâmetros de Classificação do modelo. TP=True positive; TN=True negative; FP=False positive; FN=False negative..... 58
- Figura 6: Espectros médios dos isolados de *Fusarium* utilizados na calibração do modelo de classificação dos fungos. *F. verticillioides* (CML2778) em vermelho e *F. graminearum* (CFMS1347) em verde. Pré-tratamento aplicado: dados centrados na média + SNV..... 60
- Figura 7: Modelo PCA por pixel ilustrando a separação entre as espécies. a) Gráfico do PCA do PC1 (50,7%) e PC2 (35,4); e Gráfico do PCA do PC2 (35,4%) e PC3 (5,02%); b) Imagem do PCA com as espécies *Fusarium verticillioides* e *F. graminearum*. c) Gráfico de PCA do PC1 e PC2, e do PC1 e PC3 ilustrando a separação das espécies de *Fusarium*..... 62
- Figura 8: Gráficos de *Loadings* do PCA do modelo. a) PC1 com bandas em 1056, 1412, 1843 e 1893 nm; b) PC2 com bandas em 1050, 1350 e 1900 nm; e c) PC3 com bandas em 1118, 1368, 1687 e 1862 nm..... 63
- Figura 9: Etapas do processo de modelo de classificação por PLS-DA: a) Imagem RGB dos fungos *F. verticillioides* e *F. graminearum* utilizados no modelo de classificação das espécies; b) Imagem do Contour 2D do modelo PCA antes da remoção do *background*; c) Imagem do Contour 2D do modelo PCA após remoção do *background* e com os pré-processamentos aplicados (dados centrados na média +SNV); d) e e) Imagem do modelo PLS-DA

ilustrando os conjuntos de calibração e validação.....	65
Figura 10: Modelo de PLS-DA por pixel. a) Gráfico da variável latente 1 (52,7%) vs. variável latente 2 (27,4%), 1 vs. 3 (8,57%), 1 vs. 4 (3,74%), 2 vs. 3, 2 vs. 4, e 3 vs. 4; b) Imagem da classificação de <i>F. verticillioides</i> (CML 2778) em amarelo e <i>F. graminearum</i> (CFMS 1347) em azul.....	67
Figura 11: Modelo de captura das imagens das amostras de milho utilizadas, contendo espaço entre os grãos e orientação do gérmen voltada para cima.....	70
Figura 12: Distribuição de frequência e curva normal das concentrações das fumonisinas FB1 + FB2.....	74
Figura 13: Espectros de absorvância média bruta, obtidos de todos os grãos de milho da imagem do mosaico de 51 conjuntos de amostras.....	75
Figura 14: Espectros de absorvância pré-tratados com MSC para amostra de milho em grão com teor de fumonisina (B1 + B2) acima (linha vermelha) e abaixo (linha azul) do limite da ANVISA (5000 mg.kg ⁻¹).....	75
Figura 15: Gráfico de PCA PC1 vs. PC2 (A) e gráfico <i>loadings</i> para PC1 e PC2 (B).....	77
Figura 16: Amostra predita vs. quantificada para a calibração PLS (azul) e validação externa (vermelho) definida em amostras de milho em grão.....	80
Figura 17: Esquema de metodologia utilizada para avaliar o efeito de um extrato fenólico no desenvolvimento de <i>Fusarium verticillioides</i>	85
Figura 18: Placa do teste de susceptibilidade (CIM) com a solução de EFS.....	88
Figura 19: Resumo das metodologias utilizadas.....	90
Figura 20: Crescimento de <i>Fusarium verticillioides</i> em tratamento contendo extrato fenólico incorporado ao substrato BDA (meio sólido).....	92
Figura 21: Germinação dos conídeos da amostra CML 2743 (<i>F. verticillioides</i>) em presença de EFS.....	95
Figura 22: Efeito do extrato fenólico de sorgo na germinação de conídios. Percentual de conídios germinados para as espécies fúngicas (A - N) após 24 horas em meio Caldo Batata Dextrose na ausência (SEF) e na presença (CEF) de EFS (5000 µg.mL ⁻¹). * Diferença significativa (p<0,05) em relação à ausência do EFS; ** (p<0,01); *** (p<0,001).....	96
Figura 23: Efeito do extrato fenólico de sorgo no crescimento das espécies fúngicas. Total de Unidades formadoras de colônias (UFC.mL ⁻¹) das espécies fúngicas (A - K) em 0, 8 e 24 horas na ausência e na presença de EFS (5000 µg.mL ⁻¹). *Diferença significativa (p<0,05) em relação à ausência do EFS; ** (p<0,01); *** (p<0,001).....	98

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparativo de produção – Milho safra 2020/2021.....	25
Tabela 2: Isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	52
Tabela 3: Identificação molecular de fungos do gênero <i>Fusarium</i> baseada na amplificação e sequenciamento da região ITS.....	59
Tabela 4: Bandas características no infravermelho atribuídas a espectros do gênero <i>Fusarium</i>	61
Tabela 5: Análise comparativa da aplicação de pré-tratamento ao conjunto de dados para classificação das espécies (%-pixel) no modelo PLS-DA.....	64
Tabela 6: Parâmetros de classificação para o modelo de PLS-DA em pixel para as amostras de isolados de <i>Fusarium</i> spp. do conjunto teste.....	66
Tabela 7: Dados estatísticos dos resultados do teor de fumonisinas totais (FB1 + FB2) ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) quantificados pela técnica CLAE em amostras de milho, safra 2018.....	73
Tabela 8: Desempenho da determinação quantitativa de fumonisina obtida com o método PLS e métodos de pré-tratamento.....	79
Tabela 9: Relação dos microrganismos utilizados para análise da CIM.....	86
Tabela 10: Extração de compostos fenólicos totais de sorgo utilizando diferentes solventes, em temperatura ambiente (TA) ou a 40 °C, com ou sem adição de 3% de ácido cítrico (AC).....	91
Tabela 11: Efeito do extrato fenólico de sorgo (EFS) sobre o crescimento de colônias de <i>F. verticillioides</i> em meio sólido BDA.....	92
Tabela 12: Efeito do extrato fenólico de sorgo (EFS) sobre o peso seco de colônias de <i>F. verticillioides</i> em meio líquido sem agitação (BDSA).....	93
Tabela 13: Efeito do extrato fenólico de sorgo (EFS) sobre o número de esporos de <i>F. verticillioides</i> em colônias obtidas no meio líquido mantido sobre agitação (BDCA).....	93

Lista de siglas e abreviaturas

AFB1	Aflatoxina B1
ANFB	Anfotericina B
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A. parasiticus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
BD	Meio líquido de Batata-dextrose
BDA	Ágar Batata Dextrose
BDCA	Meio líquido com agitação
BDSA	Meio líquido sem agitação
BuOH	<i>n</i> -butanol
CEF	Com extrato fenólico
CFMS	Coleção de Fitopatógenos de Milho e Sorgo
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CML	Coleção Micológica de Lavras
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DON	Desoxinivalenol
DP	Desvio padrão
EFS	Extrato fenólico de sorgo
EtOAc	Acetato de etila
FB1	Fumonisina B1
FB2	Fumonisina B2
FC	Folin-Ciocalteu
FeSO ₄ •7H ₂ O	Sulfato ferroso hepta hidratado
FLU	Fluconazol
<i>F. graminearum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
<i>F. verticillioides</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>
FN	<i>False negative</i>
FP	<i>False positive</i>
G	Força gravitacional
GAE.g ⁻¹	Equivalentes de Ácido gálico por grama
HCl	Ácido clorídrico
Hs	<i>Hibiscus sabdariffa</i>
HSI	Imagem hiperespectral
HSI-NIR	Imagem hiperespectral de infravermelho próximo
InGaAs	Arseneto de índio-gálio
ITRA	Itraconazol
KCl	Cloreto de potássio
K ₂ HPO ₄	Hidrogeno fosfato de potássio

LAMP	Amplificação circular isotérmica
LATECQ	Laboratório Avançado de Tecnologia Química
LDA	Análise discriminante linear
MCT	Telureto de mercúrio cádmio
MSC	Correção multiplicativa do sinal
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄ •7H ₂ O	Sulfato de magnésio hepta hidratado
MIA	Análise multivariada de imagens
MLR	Regressão linear múltipla
mmol/L	Milimolar
m/v	Massa/volume
NaNO ₃	Nitrato de sódio
Ng	Nanograma
NIR	Infravermelho próximo
Nm	Nanômetro
OTA	Ocratoxina
PbS	Sulfeto de chumbo
PC	Componentes principais
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR	Regressão por componentes principais
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
PLSR	Regressão por mínimos quadrados parciais
p/v	Peso/volume
qPCR	PCR em tempo real
RFLP	Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição
RMSEP	Raiz quadrada do erro médio de previsão
RPD	Desvio de desempenho da razão
Rpm	Rotação por minuto
SEF	Sem extrato fenólico
SNV	Varição normal do sinal
TA	Temperatura ambiente
TN	<i>True negative</i>
TP	<i>True positive</i>
U	<i>Rack unit</i>
UFC.mL ⁻¹	Unidades formadoras de colônias/mL
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
VL	Variável latente
v/v	Volume/volume
w/v	Massa/volume
ZEA	Zearalenona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. JUSTIFICATIVA	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 A cultura do milho	24
3.2 Principais fungos de ocorrência nos grãos de milho.....	25
3.2.1 <i>Fusarium</i> spp.	27
3.3 Micotoxinas em milho.....	29
3.3.1 Fumonisinias.....	31
3.4 Métodos tradicionais para identificação de fungos e micotoxinas.....	31
3.5 Espectroscopia no Infravermelho Próximo.....	34
3.5.1 Imagem Hiperespectral de Infravermelho Próximo (HSI – NIR).....	35
3.5.1.1 Aquisição de imagem.....	37
3.5.1.1.1 Fonte de luz.....	37
3.5.1.1.2 Monocromador.....	38
3.5.1.1.3 Detector.....	38
3.5.1.1.4 Configurações da câmera.....	38
3.5.1.2 Técnicas de pré-processamento.....	39
3.5.1.3 Análise Multivariada de Imagem.....	39
3.5.1.3.1 Abordagem da análise.....	40
3.5.1.3.2 Métodos não supervisionados.....	40
3.5.1.3.3 Métodos supervisionados.....	40
3.5.1.4 Predição e Validação.....	41
3.5.2 Aplicações da Técnica HSI-NIR na classificação de fungos.....	41
3.5.3 Aplicações da técnica HSI-NIR para quantificação de micotoxinas.....	44
3.6 Métodos alternativos naturais no controle de fungos produtores de micotoxinas.....	46
4. OBJETIVOS.....	50
4.1 Objetivo Geral.....	50
CAPÍTULO I: APLICAÇÃO DA TÉCNICA HSI-NIR ASSOCIADA À ANÁLISE MULTIVARIADA PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS TOXIGÊNICOS DAS ESPÉCIES <i>Fusarium verticillioides</i> E <i>F. graminearum</i>	51

4.2 Objetivos Específicos.....	51
5. MATERIAL E MÉTODOS	52
5.1 Classificação de <i>Fusarium</i> spp.....	52
5.1.1 Seleção das amostras.....	52
5.1.2 Identificação molecular de <i>Fusarium</i> spp.....	53
5.1.3 Análise das imagens por HSI-NIR.....	54
5.1.3.1 Preparo das amostras.....	54
5.1.3.2 Sistema de Imagens Hiperespectrais NIR.....	56
5.1.3.3 Aquisição e análise multivariada das imagens.....	56
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
6.1 Identificação molecular de <i>Fusarium</i> spp.....	59
6.2 Classificação de <i>Fusarium</i> spp. utilizando HSI-NIR.....	59
6.2.1 Análise espectral.....	59
6.2.2 Análise por componentes principais.....	61
6.2.3 Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA).....	64
CAPÍTULO II: DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS EM MILHO UTILIZANDO A TÉCNICA HSI-NIR ASSOCIADA A MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.....	68
4.2 Objetivos Específicos.....	68
5. MATERIAL E MÉTODOS	69
5.1 Coleta e seleção das amostras.....	69
5.2 Análise das imagens por HSI-NIR.....	69
5.2.1 Preparação das amostras.....	69
5.2.2 Sistema de Imagens Hiperespectrais NIR.....	70
5.2.3 Aquisição das imagens.....	70
5.2.4 Determinação de Fumonisinas (B1 e B2) utilizando a técnica CLAE.....	71
5.2.5 Construção do modelo multivariado.....	72
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
6.1 Quantificação de fumonisinas em milho pelo método HSI-NIR.....	73
CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE UM EXTRATO FENÓLICO DE SORGO NO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	82
4.2 Objetivos específicos.....	82
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	83

5.1 Isolados fitopatogênicos.....	83
5.2 Obtenção do extrato fenólico de sorgo.....	83
5.3 Avaliação do efeito antifúngico do extrato fenólico de sorgo (EFS).....	84
5.3.1 Efeito antifúngico do EFS em meio sólido e líquido.....	84
5.3.2 Concentração inibitória mínima (CIM) do EFS.....	86
5.3.2.1 Preparo do inóculo.....	87
5.3.2.2 Teste de susceptibilidade dos fungos ao extrato fenólico de sorgo.....	87
5.3.3 Taxa de germinação de conídeos.....	88
5.3.4 Curva de crescimento.....	89
5.3.5 Análise dos dados.....	89
6 RESULTADOS E DUSCUSSÃO.....	91
6.1 Avaliação do extrato fenólico de sorgo como agente antifúngico no desenvolvimento de fungos fitopatogênicos.....	91
6.1.1 Teste de extração de compostos fenólicos de sorgo.....	91
6.1.2 Avaliação do efeito antifúngico de compostos fenólicos de sorgo para <i>F. verticillioides</i>	92
6.1.3 Avaliação da susceptibilidade dos fungos fitopatogênicos ao extrato fenólico de sorgo.....	94
6.1.4 Efeito do extrato fenólico de sorgo no crescimento conidial de fungos.....	95
6.1.5 Efeito do extrato fenólico de sorgo no crescimento fúngico.....	97
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	103
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
10. PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS.....	127
11. PUBLICAÇÕES.....	129

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo, assim como o arroz e o trigo (FAO, 2016). A elevada importância socioeconômica do milho pode ser evidenciada pela expansão da área de cultivo e seu uso extensivo em diversos produtos para rações e alimentos, produção de biocombustíveis e matéria-prima nas indústrias (NUSS & TANUMIHARDJO, 2010; KLOPFENSTEIN et al., 2013; XUE et al., 2014). Milhões de pessoas no mundo inteiro consomem o milho indiretamente sob a forma de ovos, xarope, carne bovina e suína e em países em desenvolvimento da América Latina, África e parte da Ásia, o milho é consumido diretamente como alimento básico (RANUM et al., 2014).

O milho é uma cultura agrícola altamente suscetível à infecção por fungos patogênicos, tanto antes quanto depois da colheita, os quais podem produzir micotoxinas, tornando os grãos impróprios para o consumo (QUEIROZ et al., 2013). Os fungos do gênero *Fusarium*, principalmente *F. verticillioides* e *F. graminearum*, são os que mais acometem os grãos de milho e se destacam por serem responsáveis pela produção das principais micotoxinas nesse cereal (CASTRO, 2011; KUHNEM JÚNIOR et al., 2013).

Neste contexto, existe uma grande preocupação de especialistas, como os micologistas e os fitopatologistas, acerca do crescente aumento de contaminação por espécies de *Fusarium* e a necessidade de identificá-las, além das grandes indústrias que exigem uma rápida e precisa detecção e quantificação de micotoxinas (CARVALHO, 2017; FEMENIAS et al., 2020).

A identificação taxonômica desses fungos patogênicos é uma etapa inicial de controle de doenças em milho, porém os métodos mais tradicionais de diferenciação de espécies requerem um alto nível de conhecimento, além de consumirem bastante tempo de execução (SOUZA, 2014). Assim, técnicas moleculares, baseadas na caracterização de ácidos nucleicos, que permitem a identificação de microrganismos e possibilitam a distinção de espécies têm sido utilizadas, a fim de se obter diagnósticos mais precisos e específicos (SOUZA, 2014; STURARO, 2018). Entretanto, essas técnicas moleculares são dispendiosas e ainda demoradas, o que estimulou a busca por novos métodos de identificação de espécies de fungos (SENTHILKUMAR et al., 2016).

Diversas técnicas são aplicadas para detecção e quantificação de micotoxinas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que apresenta grande sensibilidade, seletividade e precisão, porém, assim como as técnicas de identificação de fungos, essas são demoradas, dispendiosas e causam destruição da amostra (FEMENIAS et al., 2020).

Visando a obtenção de um método não destrutivo, com menor uso de produtos químicos e de execução mais rápida, a técnica de imagem hiperespectral de infravermelho próximo (*Near infrared hyperspectral imaging* – HSI NIR) associada à análise de imagem multivariada foi desenvolvida permitindo uma medição rápida da amostra, além de uma precisão maior na distinção dos patógenos (YAO et al., 2008; BEZUIDENHOUT, 2018). Esse método fornece informações espectrais e espaciais de um objeto, sendo estas combinadas para a obtenção de uma imagem hiperespectral NIR. A composição química e a natureza física de um material podem influenciar na análise espectroscópica, uma vez que os dados obtidos dependem da interação entre a radiação eletromagnética e átomos ou moléculas. O sistema HSI-NIR utiliza das informações contidas no espectro de energia que é emitido ou absorvido, a fim de adquirir os dados desejados, que são chamados, em geral, de espectros de refletância (BEZUIDENHOUT, 2018).

A utilização da HSI NIR pode auxiliar na identificação precoce de fungos, fator que poderá contribuir também para o controle mais precoce de doenças em plantas, podendo também ser uma técnica alternativa para detecção e quantificação de micotoxinas (SENTHILKUMAR et al., 2016; FEMENIAS et al., 2020). A técnica de HSI NIR pode auxiliar as indústrias de alimentos e rações permitindo a análise e rejeição de lotes contaminados por micotoxinas em um curto período de tempo (FEMENIAS et al., 2021). A aplicação dos métodos associados a essa técnica pode substituir outros métodos mais dispendiosos e demorados, podendo ser utilizada como um ferramenta de triagem de micotoxinas (FEMENIAS et al., 2021).

Além da identificação precoce dos fungos causadores de doenças em plantas, outros métodos de controle devem ser aplicados a fim de inibir o crescimento de fungos nas plantas como, por exemplo, a utilização de agentes antifúngicos. Os antifúngicos são conhecidos por apresentarem excelentes resultados quanto à inibição do crescimento e proliferação de fungos em plantas

(SCHURT et al., 2017). As plantas, os animais e os microrganismos são utilizados como agentes antifúngicos, dentre esses, os mais comuns são os compostos naturais e as drogas sintéticas. Os óleos essenciais, os extratos naturais e os antifúngicos comerciais como os azóis, equinocandinas e polienicos estão entre os mais utilizados na prevenção de doenças fúngicas (PARENTE-ROCHA et al., 2017).

O crescente interesse por produtos naturais para utilização no combate aos agentes fúngicos está associado ao fato de que os antifúngicos sintéticos disponíveis são conhecidamente tóxicos e podem afetar o ambiente e a saúde humana e animal (SCORZONI et al., 2016; SCHURT et al., 2017). Os compostos fenólicos são classificados como metabólitos secundários presentes em plantas e apresentam uma gama de efeitos biológicos, incluindo, antioxidantes, antivirais, antitumorais e antibacterianos (HAMINIUK et al., 2012). Entretanto, poucos trabalhos relatam sua eficácia como agentes antifúngicos.

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é um cereal que se destaca por suas propriedades nutricionais e funcionais (QUEIROZ et al., 2015; PAIVA et al., 2017; QUEIROZ et al., 2018). Seus grãos podem ser uma rica fonte de diversos compostos fenólicos como, os ácidos fenólicos, as antocianinas e os taninos, os quais estão concentrados no pericarpo (MORAES et al., 2015).

Dessa forma, os objetivos do trabalho foram: utilizar a tecnologia de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo e técnicas de análise multivariada de imagens para desenvolver um método de classificação de fungos do gênero *Fusarium* e quantificação de fumonisinas, bem como analisar o efeito antifúngico de extrato fenólico de sorgo sobre o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos.

2 JUSTIFICATIVA

A contaminação de milho e de seus produtos com microrganismos patogênicos pode causar graves consequências aos seus consumidores, sendo motivo de grande preocupação em nível mundial. Por isso, nos últimos anos, a busca por alternativas para garantir a segurança dos alimentos tem sido o foco de ações internacionais (MOTTA et al., 2015). Entre esses patógenos, os fungos podem produzir diversas micotoxinas que são extremamente prejudiciais à saúde humana e animal (BEZUIDENHOUT, 2018). Dessa forma, a detecção precoce da contaminação fúngica em cereais de grande importância comercial, como o milho, é uma medida que poderá auxiliar na prevenção da contaminação por micotoxinas em toda a cadeia produtiva desse cereal (WILLIAMS et al., 2012).

Os fungos do gênero *Fusarium* são os que mais acometem os grãos de milho e se destacam por serem responsáveis pela produção das principais micotoxinas nesse cereal (CASTRO, 2011). As principais espécies patogênicas de *Fusarium* encontradas na cultura do milho são *F. verticillioides*, principal produtor da micotoxina fumonisina e *F. graminearum*, que está associado à produção de zearalenona (BEZUIDENHOUT, 2018).

As espécies do gênero *Fusarium* são mutáveis devido a sua composição genética e a variações morfológicas, resultantes de alterações no meio ambiente, tornando-se necessária a aplicação de técnicas que promovam a diferenciação entre elas (CASTRO, 2011; MILANESI, 2012). No entanto, é de grande importância a distinção entre as espécies, visto que cada um dos patógenos produz diferentes tipos de micotoxinas (BEZUIDENHOUT, 2018). O uso de critérios morfológicos como, forma, tamanho e cor dos conídios são métodos tradicionais, entretanto, devido às variações morfológicas e interpretações subjetivas, as identificações podem ser equivocadas (MONTEIRO, 2012; SILVA et al., 2015). Assim, a identidade desses fungos pode ser determinada por sua composição genética. Dessa forma, técnicas moleculares que utilizam o ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid* - DNA), têm sido utilizadas com sucesso na diferenciação de espécies de fungos patogênicos (MENEZES et al., 2010; AIRES et al., 2018). Porém, essas técnicas são trabalhosas, lentas, complexas e dispendiosas, quando comparadas com técnicas microbiológicas (AIRES et al., 2018). Assim como as técnicas descritas para análises de

identificação de fungos, as estratégias bem conhecidas para quantificação de micotoxinas, como CLAE e ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), que são amplamente utilizadas, apresentam as dificuldades antes citadas (FEMENIAS et al., 2021).

No que tange à diferenciação entre as espécies de fungos produtores de micotoxinas em milho, existe a necessidade de uma técnica rápida, não destrutiva e que possibilite a diferenciação entre as principais espécies de *Fusarium* produtoras de micotoxinas no milho e a identificação e a quantificação delas.

Nos últimos anos, os métodos analíticos modernos utilizam técnicas instrumentais capazes de realizar medidas em amostras sólidas, líquidas ou gasosas, empregando pouco tratamento químico reduzindo, assim, o tempo de análise e a quantidade de resíduos gerados (SOARES, 2016). Técnicas de reflectância ou espectroscopia de transmitância, seja no visível (VIS) ou infravermelho próximo (NIR) foram utilizados com sucesso para detecção de contaminação fúngica e toxinas em cereais (DEL FIORE et al., 2010).

A tecnologia de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo (*Hyperspectral image - HSI*) é um método rápido, eficaz, não invasivo, que não utiliza produtos químicos, e que tem sido empregada na caracterização de diversas variáveis de qualidade de cereais e oleaginosas (WILLIAMS et al., 2012; SENTHILKUMAR et al., 2017). Esta técnica pode ser utilizada em laboratórios microbiológicos como instrumento de triagem/rastreio rápido de amostras contaminadas por fungos, identificando e distinguindo os patógenos. Testes subsequentes, como estratégias eficientes para separar amostras contaminadas e sem contaminação podem ser realizados para detecção e identificação de outros compostos, como as micotoxinas, evitando a entrada dessas na cadeia alimentar dos consumidores (BEZUIDENHOUT, 2018; FEMENIAS et al., 2021). A aplicação dessa técnica pode ser uma estratégia rápida e de baixo custo para discernir entre lotes de amostras livres e contaminados com micotoxinas, avaliando, prevenindo no consumo desses alimentos (FEMENIAS et al., 2021).

Nos últimos anos, a tecnologia HSI-NIR, começou a ser utilizada para a detecção da contaminação do milho por fungos patogênicos, como *Fusarium* e na detecção e quantificação de micotoxinas produzidas por espécies desse gênero (WILLIAMS et al., 2010).

Além da detecção precoce de fungos e de micotoxinas, métodos alternativos de controle de fungos toxigênicos em alimentos e que gerem menor impacto ao ambiente, à saúde humana e animal têm sido largamente recomendados. Estudos têm mostrado que, o consumo brasileiro de agrotóxicos é equivalente a 20% de todo agrotóxico produzido mundialmente e, em 2016 as vendas brasileiras corresponderam a mais de R\$ 184 bilhões (HALFELD-VIEIRA et al., 2016; de MORAES, 2019). Embora o uso de defensivos químicos para controle de doenças na agricultura tenha se intensificado nas últimas décadas, esses podem acarretar riscos ambientais e toxicológicos, além de apresentarem elevados custos (BETTIOL et al., 2014). Esses efeitos têm impulsionado as buscas por formas alternativas de controle de doenças em plantas. Apesar da descoberta de novas moléculas com a toxicidade reduzida e biodisponibilidade aumentada, a busca por novos agentes antifúngicos mais sustentáveis é necessária. As plantas são os principais recursos para produtos naturais que possuem grande potencial antimicrobiano, o uso desses produtos naturais como agente antifúngico consiste em uma alternativa de interesse econômico e ecológico bastante promissor. As plantas são potenciais produtoras de compostos antifúngicos devido à sua extensa capacidade biossintética (SCORZONI et al., 2016).

Nesse sentido, os compostos fenólicos têm sido relatados como eficientes agentes antibacterianos (SERRANO et al., 2009). Entre as plantas fontes desses compostos, o sorgo tem se destacado devido ao seu conteúdo e diversidade de fenólicos, os quais concentram-se, especialmente, no pericarpo dos grãos. O sorgo é um cereal de grande importância alimentar em todo o mundo e rico em fitoquímicos como, os ácidos fenólicos, os taninos, as antocianinas, os policosanóis e os fitoesteróis (AWIKA e ROONEY, 2004; OLIVEIRA et al., 2017). Além disso, estudos recentes demonstraram que o sorgo possui efeitos antioxidantes, anticarcinogênicos e agentes redutores de colesterol entre outros (OLIVEIRA et al., 2017). Entretanto, há pouca informação sobre os efeitos antimicrobianos dos compostos fenólicos do sorgo.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi utilizar a tecnologia de imagens hiperespectrais de infravermelho próximo para desenvolver um método para classificação de fungos do gênero *Fusarium*, e um modelo para quantificação de

fumoninas, bem como analisar a atividade antifúngica de compostos fenólicos obtidos de grãos de sorgo sobre o desenvolvimento de *Fusarium verticillioides*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.), pertence à família *Poaceae* (Gramineae) e é uma planta herbácea que apresenta caráter monóico e robusto, além de possuir ciclo anual com, praticamente, 100% de reprodução cruzada (GOMES et al., 2011; CRUZ, 2013). A sua semente é composta pelo pericarpo (camada externa, composta de fibra), embrião (composto pelo cotilédone, epicótilo e radícula) e endosperma (BELTRÃO, 2011; CRUZ, 2013). O endosperma corresponde a 75–80% do grão e seus principais constituintes são amido e proteínas (GASPERINI, 2011).

O milho é um alimento nutritivo cuja composição inclui as vitaminas A e do complexo B, proteínas, carboidratos, gorduras, ferro, cálcio, amido e fósforo (CRUZ, 2010). O ciclo produtivo do milho compreende cinco etapas: germinação e emergência, crescimento vegetativo, florescimento, frutificação e maturidade (CRUZ, 2013).

O milho é amplamente cultivado e consumido em todo o mundo. Os Estados Unidos, a China e o Brasil são os países que apresentam maior produção e consumo (SILVA et al., 2015). De acordo com a estimativa do décimo levantamento da safra 2020/2021, no ranking mundial de produção de milho, o Brasil ocupa o terceiro lugar, com 109,0 milhões de toneladas, precedido apenas pelos Estados Unidos e China, com produção de 360,3 e 260,7 milhões de toneladas, respectivamente. Referindo-se ao consumo, o Brasil é o quarto país com maior consumo deste cereal, com 70,0 milhões de toneladas e os Estados Unidos, a China e a União Européia, se apresentam no topo do ranking com 305,5; 289,0 e 77,0 milhões de toneladas consumidas, respectivamente (FIESP, 2021).

No Brasil, o milho ocupa o segundo lugar no ranking dos cereais em termos de produção, superado apenas pela soja (CONAB, 2021). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (2021), as estimativas da safra de 2020/2021 são de 19,0 milhões de hectares de área total cultivada, com produção de 102,4 milhões de toneladas e produtividade média de 5,5 mil kg/hectare.

Conforme descrito na Tabela 1, a Região Sudeste é a terceira maior produtora de milho no Brasil, perdendo apenas para as Regiões Sul e Centro-Oeste (CONAB, 2021).

Tabela 1: Comparativo de produção – Milho safra 2020/2021.

Região/UF	Produção (mil ton)
Norte	3307,2
Nordeste	7981,6
Centro-Oeste	59263,7
Sul	22525,5
Sudeste	12403,6

Adaptação do 5º Levantamento de safra de grãos (CONAB, 2021).

O milho tem alta relevância na economia brasileira, devido aos seus diversos usos, destacando-se a alimentação humana e a animal (CRUZ, 2013). Esse cereal é utilizado como matéria-prima para fabricação de diversos produtos, inclusive nas indústrias de alta tecnologia, como a farmacêutica e na produção de etanol, papéis, adesivos, filmes e embalagens biodegradáveis (PAES, 2008; CANCELLIER et al., 2011).

3.2 Principais fungos de ocorrência em grãos de milho

Com ampla distribuição geográfica e grande importância econômica os fungos são microrganismos utilizados em diversas áreas como, a produção de alimentos, fármacos, enzimas e ácidos orgânicos (SILVA et al., 2015). Porém, alguns fungos são patogênicos para plantas e deterioradores de alimentos, o que gera grande preocupação nas indústrias alimentícias e na saúde pública, pois podem causar redução no valor nutritivo dos alimentos, produção de metabólitos secundários tóxicos e doenças em humanos e animais (SILVA et al., 2015).

O milho é uma cultura suscetível ao ataque e ao desenvolvimento de fungos patogênicos causadores de diversas doenças. Além disso, a infecção fúngica pode comprometer direta e indiretamente a qualidade dos grãos de milho e seus derivados, reduzindo sua qualidade sanitária e física e interferindo na sua classificação comercial (CASTRO, 2011; BENTO et al., 2012).

Alguns danos causados pelos fungos são: o emboloramento visível, a descoloração, o odor desagradável, o aquecimento, a perda de matéria seca, as

mudanças químicas e nutricionais e a produção de compostos tóxicos, que tornam os grãos de milho impróprios para o consumo humano e animal (BENTO et al., 2012).

Os fungos patogênicos podem infectar o grão, tanto antes quanto após a colheita e são denominados, respectivamente, de fungos de campo e de armazenamento (SILVA et al., 2015). Entre os principais fungos presentes no campo e que são encontrados em colmos, sementes e folhas do milho estão, *Stenocarpella maydes* (*Diplodia maydes*), *Stenocarpella macrospora* (*Diplodia macrospora*), *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Cephalosporium* spp, *Colletotrichum graminicola*, *Bipolares maydes*, *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp. e *Gibberella zeae* (SANTIN et al., 2004; ALVES et al., 2012). As espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os principais contaminantes do milho na secagem e no armazenamento (HERMANNNS et al., 2006). Alguns fungos são chamados de intermediários, pois se desenvolvem em grãos maduros ou imaturos, desde que o período esteja próximo do armazenamento ou da pós-colheita. Esse grupo compreende os fungos dos gêneros *Epicoccum*, *Nigrospora* e *Papularia* (FIGUEIRA et al., 2003).

Os fungos que mais acometem e se destacam por serem responsáveis pelas principais doenças causadas no milho, provocando deterioração dos grãos pertencem aos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (CASTRO, 2011; BENTO et al., 2012).

Entre os fungos fitopatogênicos, o gênero *Fusarium* é conhecido como um dos mais importantes patógenos de plantas do mundo e tem recebido grande atenção devido à sua alta incidência e capacidade de produção de micotoxinas, provocando contaminação de alimentos e, assim, comprometendo a segurança alimentar (PASQUALI et al., 2016). Dentre as principais espécies fitopatogênicas do gênero estão, *F. verticillioides* e *F. graminearum*, as quais são capazes de produzir uma grande variedade de micotoxinas no milho como, Fumonisinás e Fusarinás (*F. verticillioides*) e Desoxinivalenol (DON) e Zearalenona (ZEA) (*F. graminearum*), que podem causar danos à saúde humana e animal (PASQUALI et al., 2016). Além disso, são as principais espécies associadas à redução de produtividade de milho, resultando em danos na qualidade dos grãos (KUHNEM JÚNIOR et al., 2013).

3.2.1 *Fusarium* spp.

Os fungos do gênero *Fusarium* pertencem ao Reino Fungi, ao Filo Ascomycota, à Classe Sordariomycetes, à Ordem Hypocreales e à Família Nectriaceae e foram descritos e classificados pela primeira vez em 1809 pelo micólogo alemão Link (BOEIRA, 2012; MACIEL, 2012). Esse gênero possui uma grande diversidade de espécies fitopatogênicas, endofíticas e sapóbrias do solo e, assim como outros fungos, sua dispersão pode ocorrer através de seus propágulos pela chuva, vento e animais (BOEIRA, 2012).

O gênero *Fusarium* possui ampla distribuição geográfica e é encontrado em todos os tipos de solos, onde podem permanecer sob a forma de clamidósporos ou como hifas, ou associado com diversas espécies de vegetais, colonizando geralmente ramos, folhas, frutos e inflorescências (MENEZES et al., 2010; MILANESI, 2012). Ocorre, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais e, também, nas regiões temperadas sob condições de clima frio (BOEIRA, 2012; FRIAS, 2014).

O *Fusarium* é um dos principais gêneros de fungos que acometem o grão de milho e sua distribuição pode estar associada aos diferentes tipos de clima, a vegetação, a microbiota, ao tipo de solo e aos nutrientes (MILANESI, 2012). Esse gênero apresenta aproximadamente 775 espécies e subespécies, sendo que algumas ocorrem com maior frequência, pois, possuem ampla adaptação a diferentes condições ambientais, enquanto outras são específicas de certos ambientes (MACIEL, 2012; MILANESI, 2012; FRIAS, 2014). Esses fungos caracterizam-se por possuírem crescimento rápido, colônias com colorações pálidas e coloridas e micélio aéreo e ramificado (MARTINS, 2005).

O tamanho e a forma dos esporos são as principais características para o reconhecimento das espécies de *Fusarium* (SANDOVAL, 2010). Os microconídios e os macroconídios são as duas principais formas de esporos de *Fusarium* (MARTINS, 2005). Os microconídios são comumente unicelulares, uninucleados e fusiformes, enquanto os macroconídios mais comuns são multicelulares, porém, cada célula apresenta somente um núcleo (SANDOVAL, 2010).

Várias doenças em plantas podem ser associadas às espécies do gênero *Fusarium* como, podridão das raízes, caules e frutos (MENEZES et al., 2010). As principais espécies patogênicas de *Fusarium* que são encontradas na cultura do

milho e seus subprodutos são *F. verticillioides* e *F. graminearum* (Figura 1). Estas espécies causam diversas doenças, podendo levar a reduções na produtividade e na qualidade dos grãos (KUHNEM JÚNIOR et al., 2013). *Fusarium verticillioides* é a espécie que apresenta maior associação com os alimentos (CASTRO, 2011).

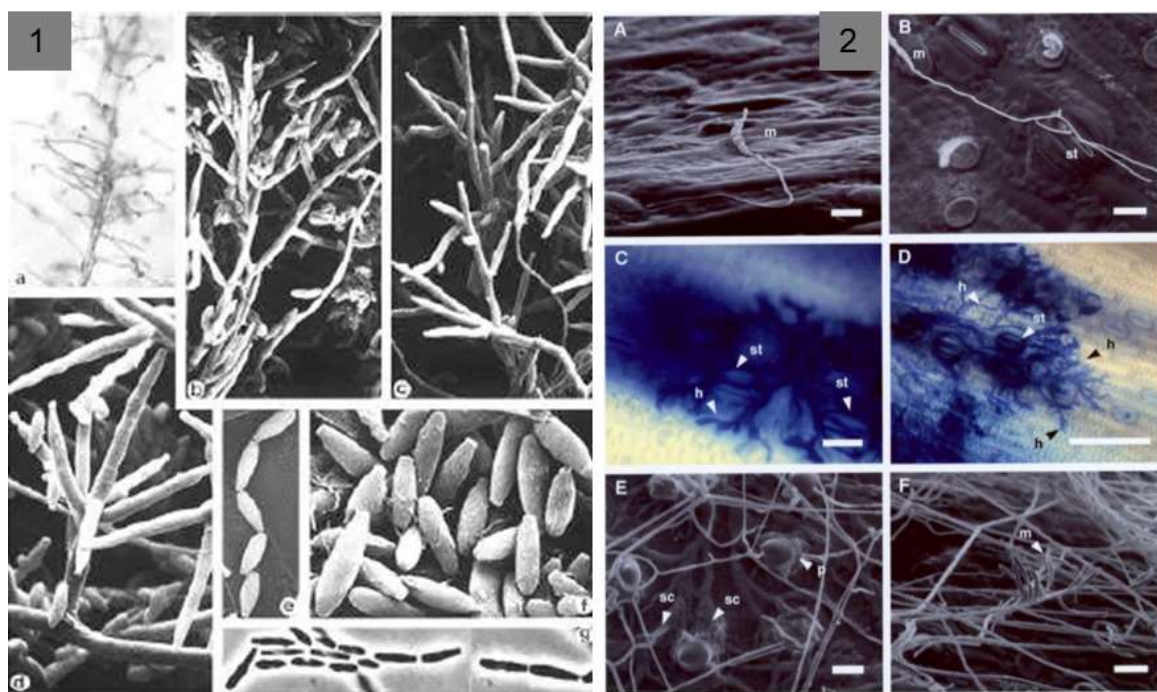


Figura 1–1.1 *Fusarium verticillioides* em microscopia eletrônica. (a) Monofiálides com cadeias de conídios; (b-d) conidióforos e microconídios; (e-g) macroconídios. Fonte: NICOLAU, 2014. 1.2 *Fusarium graminearum* na superfície abaxial das glumas de trigo. (a-b) e (e-f) microscopia eletrônica de varredura: a) microconídio germinando e b) hifas em contato com um estoma; e) hifas subcuticulares sob hifas mais finas crescendo acima da superfície cuticular; f) macroconídio em um conidiósporo; (c-d) micrografias de campo claro de superfícies abaxiais em amostras coradas com algodão-blue lactofenol: Hifas espessadas e ramificadas. Fonte: PRITSCH et al., 2000.

Associado às inúmeras doenças em todas as fases de desenvolvimento do milho *F. verticillioides* e *F. graminearum* são causadores de danos em plântulas e podridão da raiz, do colmo e da espiga, além de deteriorar grãos no armazenamento (BORDINI et al., 2013). Entretanto, a infecção pode ocorrer de forma assintomática, não ocasionando doenças visíveis, relação chamada de endofítica (BORDINI et al., 2013).

F. verticillioides contamina o milho, principalmente por meio da infecção dos estigmas pelos conídios disseminados pelo ar ou pela água, porém, a contaminação também pode ocorrer por meio da circulação sistêmica caulinar, em

que a doença se estabelece na semente chegando à espiga e grãos, pela raiz atingindo os grãos por meio do colmo e espigas, e através de ferimentos causados por insetos (BORDINI et al., 2013). É uma espécie frequentemente encontrada em sementes e grãos de milho em todo o território brasileiro, enquanto o *F. graminearum* é mais comumente encontrado na região sul do país (STUMPF et al., 2013).

De acordo com estudos filogenéticos, o complexo de *F. graminearum* abrange pelo menos 15 espécies, e podem infectar as espigas de milho através de macroconídeos ou ascósporos que penetram os grãos de espigas expostas ou danificadas por insetos, roedores e pássaros (SARVER et al., 2011; HARRIS et al., 2016). Além disso, podem produzir conídios assexuados que infectam as raízes das plântulas, causando podridão da raiz, porém, dependendo do desenvolvimento e do local da infecção, podem, também, provocar podridão do caule e da espiga do milho (MUNKVOLD & WHITE, 2016). A germinação dessa espécie ocorre entre 6-12 horas após contato com a planta, formando uma rede de hifas que crescem de forma assintomática (HARRIS et al., 2016).

Entre os fungos fitopatogênicos, *Fusarium*, principalmente das espécies *F. verticillioides* e *F. graminearum*, têm recebido grande atenção devido à alta capacidade de síntese de micotoxinas altamente tóxicas, como as fumonisinas e a fusarina C (*F. verticillioides*), e o desoxinivalenol (DON) e a zearalenona (ZEA) (*F. graminearum*) (PASQUALI et al., 2016).

3.3 Micotoxinas em milho

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos. São compostos não-essenciais ao desenvolvimento do fungo, que são formados no estágio final da fase exponencial de crescimento, em geral, quando se tem o acúmulo de metabólitos primários usados como precursores (MAZIERO & BERSOT, 2010; BOEIRA, 2012; ZAMARIOLA, 2016). A origem do termo micotoxina vem da palavra grega “mykes”, que significa fungos, e do latim “toxicum” que se refere a toxina (PELUQUE, 2014).

Várias espécies de fungos toxigênicos são responsáveis pela síntese das micotoxinas que podem contaminar o alimento durante a produção, processamento, armazenamento e estocagem (SILVA et al., 2015). Na literatura

são descritas mais de 300 tipos de micotoxinas, envolvendo distintos heteroátomos e grupos funcionais (ZAMARIOLA, 2016).

As micotoxinas são encontradas em uma extensa variedade de alimentos, principalmente em produtos agrícolas como, milho, trigo, cevada, sorgo, arroz, entre outros, que fazem parte da dieta alimentar de animais e humanos (MOTTA et al., 2015). Essas substâncias têm causado grande preocupação sendo motivo de estudos em todo o mundo, uma vez que podem ocasionar sérios danos na saúde humana e animal e por serem de difícil controle e termoestáveis (NICOLAU, 2014). Além disso, são responsáveis por grandes perdas econômicas, principalmente nos setores agrícola e pecuária (ZAMARIOLA, 2016).

A exposição dos seres humanos às micotoxinas ocorre pela ingestão de alimentos e de seus produtos contaminados, bem como pelo consumo de produtos derivados dos animais, como leite, queijos, carne, entre outros (BOEIRA, 2012). A ingestão de produtos contaminados com micotoxinas pode acarretar sérios problemas à saúde humana e animal. Essas doenças são denominadas micotoxicoses, cuja gravidade depende de fatores como, grau de exposição, toxicidade da micotoxina, idade e estado nutricional do indivíduo (ZAMARIOLA, 2016). As doenças variam de acordo com a micotoxina e seus efeitos são não contagiosos e não infecciosos, já que são relacionados à contaminação por alimentação (CRUZ, 2010).

As micotoxicoses podem gerar doenças agudas ou crônicas e seus sinais e sintomas podem incluir lesões na pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, hematotoxicidade, neurotoxicidade, genototoxicidade, podendo levar à morte rápida ou à formação de tumores (PEREIRA & SANTOS, 2011; BOEIRA, 2012). Além desses efeitos, as micotoxinas podem ser mutagênicas, carcinogênicas, teratogênicas e imunossupressoras (BOEIRA, 2012).

Uma mesma micotoxina pode ser produzida por diferentes espécies de fungos, e um fungo pode também produzir vários tipos de micotoxinas. As principais espécies de fungos produtores de micotoxinas pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (MAZIERO & BERSOT, 2010; BENTO et al., 2012). Esses fungos são produtores das principais micotoxinas encontradas em alimentos e que são denominadas de aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, fumonisinas, patulina e deoxinivalenol (CRUZ, 2010).

3.3.1 Fumonisinias

As fumonisinias são produzidas, principalmente, pelo gênero fúngico *Fusarium* e, por apresentarem ampla distribuição, grande ocorrência e alta toxicidade, são consideradas as mais importantes dentre as micotoxinas produzidas por esses fungos (COSTA et al., 2014).

A contaminação pela espécie *F. verticillioides* é muito comum no período de pré-colheita, sendo encontrada com maior frequência em grãos recém-colhidos, apresentando níveis de contaminação de até 100% (BARROSO, 2013; CONCEIÇÃO, 2015). Entretanto, outras espécies do gênero *Fusarium* também são produtoras de fumonisinias: *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. subglutinans*, *F. polyphialidicum* e *F. oxysporum* (CRUZ, 2010).

Até o momento foram caracterizadas e isoladas 28 moléculas análogas de fumonisinias, sendo B1, B2 e B3 as que ocorrem com maior frequência. Entretanto a B1 é considerada a mais tóxica e abundante, constituindo aproximadamente 70% da concentração total de fumonisinias (MIGUEL et al., 2015). As fumonisinias são as micotoxinas mais comumente encontradas em milho e seus derivados, sendo relacionada a severas doenças em animais e humanos devido ao consumo do produto contaminado (PELUQUE, 2014). Algumas doenças têm sido associadas à presença de fumonisinias em alimentos, como câncer de esôfago em humanos, leucoencefalomalácia em equinos e coelhos, edema pulmonar e hidrotórax em suínos, e efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos em camundongos (ROCHA et al., 2014).

Por ser uma micotoxina termoestável, a fumonisina pode permanecer em grande parte dos cereais, mesmo após ser submetida a diferentes tipos de processamento (PELUQUE, 2014).

3.4 Métodos tradicionais para identificação de fungos e micotoxinas

As técnicas convencionais de identificação de fungos são baseadas na combinação de análises microscópicas e morfológicas do crescimento do microrganismo em cultura. Porém, são análises demoradas e que requerem um alto nível de conhecimento profissional.

Esses métodos tradicionais são de extrema importância para uma identificação inicial dos fungos, sendo que, tanto as características físicas quanto as fisiológicas, utilizadas como marcadores morfológicos para distinguir as espécies de *Fusarium* (CARVALHO, 2017). Entretanto, a possibilidade de equívoco na identificação, utilizando essa técnica é alta, pois, o número de caracteres para distinguir as espécies é muito pequeno e a expressão deles pode ser pelo do ambiente (CARVALHO, 2017).

O uso das técnicas moleculares baseadas na caracterização de ácidos nucleicos tem possibilitado uma precisa diferenciação de espécies e até mesmo variações dentro de espécies de fungos filamentosos, bem como redução no tempo de análise (CARVALHO, 2017; MILLER & ASSI, 2013). As técnicas moleculares mais usadas são as que empregam a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) incluem várias modalidades como, reação em cadeia da polimerase simples, transcriptas e reversa, *multiplex*, *nested* em tempo real e outras, polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP), amplificação circular isotérmica (*Loop-mediated isothermal amplification*-LAMP) e microarranjo (KÖLJALG et al., 2013).

A técnica PCR é rápida e eficiente e se baseia na amplificação exponencial artificial (*in vitro*) de um fragmento de ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid* – DNA). Esse método compreende três fases: i) desnaturação - em que ocorre a separação da dupla hélice do DNA por meio de aquecimento, originando duas cadeias separadas; ii) Hidratação – onde a temperatura é reduzida de modo que ocorra ligação entre os iniciadores; iii) Extensão do DNA – a temperatura é elevada e a enzima DNA polimerase é ativada reconhecendo os sítios de ligação entre os iniciadores e o DNA alvo. Ao final do método têm-se duas novas cadeias de DNA para cada alvo e, a partir de cada molde são geradas mais duas cadeias novas, levando ao crescimento exponencial da amostra (PELT-VERKUIL et al., 2008).

Outras técnicas de PCR, como PCR em tempo real (*Real time* PCR - qPCR) apresenta alta especificidade, sensibilidade e rapidez, combinando a amplificação do DNA com imediata detecção de fluorescência permitindo a quantificação do DNA (SOUZA, 2014).

O sequenciamento de DNA é outra técnica que tem sido muito utilizada na diferenciação de espécies de fungos. É um método que pode oferecer uma diferenciação mais objetiva do que outras técnicas convencionais. Essa técnica envolve cinco etapas: i) preparação das amostras de DNA, ii) formação dos fragmentos complementares à fita molde do DNA, iii) separação dos fragmentos por eletroforese em gel, iv) detecção desses fragmentos e v) análise dos dados (SOUZA, 2014; STURARO, 2018).

A técnica de microarranjo de DNA se tornou um método muito utilizado, também, para a detecção e análise de vários fungos patogênicos. Essa técnica é utilizada para identificação de fragmentos de DNA e pode distinguir simultaneamente um grande número de microrganismos (CHOU et al., 2004; CHOU et al., 2006; HUANG et al., 2006; MILLER & TANG, 2009; DILL & GHINDILIS, 2009,).

As estratégias aplicadas para detecção de micotoxinas são amplamente conhecidas, dentre essas, destacam-se os métodos cromatográficos, comumente utilizados, baseados em colunas de imunoafinidade e os ensaios imunoenzimáticos (FEMENIAS, 2021).

As colunas de imunoafinidade, como fase de extração das micotoxinas, é uma das técnicas de separação mais utilizadas, pois aumentam a seletividade dos métodos de análise mais comuns. As colunas de imunoafinidade apresentam anticorpos específicos para cada tipo de micotoxina. Essa técnica apresenta alta especificidade, recuperação, simplicidade e um melhor limite de detecção (PEREIRA et al., 2014). A técnica apresenta vantagens como interação específica anticorpo – analito e rapidez na análise. Porém, alguns pontos são destacados negativamente, como a possibilidade de interação dos anticorpos com outras micotoxinas não específicas da coluna, além de ser uma técnica dispendiosa e que permite apenas uma única utilização da coluna (PEREIRA et al., 2014).

Técnicas de imunoenaios são baseadas na interação antígeno-anticorpo. Atualmente ELISA é a técnica mais utilizada, baseada em um teste que possui anticorpo específico para certa micotoxina, apresentando resultados semiquantitativos através de coloração (PEREIRA et al., 2014). Apresenta vantagens como a rapidez, o baixo custo e a simplicidade de uso, por ser portátil e de fácil execução (PLEADIN et al., 2012). No entanto, apresenta desvantagens,

como, reatividade cruzada para outras micotoxinas e uso único dos kits, o que pode aumentar os custos de triagem (PEREIRA et al., 2014).

Recentemente, técnicas cromatográficas como o LC acoplado ao MS têm sido mais utilizadas. Esse método possibilita a identificação e a quantificação simultâneas, mesmo que em níveis baixos, de quase todas as micotoxinas, porém é um método dispendioso e que necessita de profissionais capacitados (PEREIRA et al., 2014). Por se tratar de uma técnica com alta especificidade, vários métodos de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) com detecção por ultravioleta (UV) ou FLD foram adotados como técnicas em métodos oficiais ou padrão pela AOAC International e pelo Comitê Europeu de Padronização (CEN) para quantificar micotoxinas em cereais (PASCALE, 2009).

3.5 Espectroscopia no Infravermelho Próximo

Os métodos tradicionais para a identificação de fungos requerem a utilização de diversos produtos químicos e consumíveis laboratoriais, a necessidade de profissional qualificado, equipamentos sofisticados e infraestrutura laboratorial e, normalmente, são métodos destrutivos para as amostras (SENTHILKUMAR et al., 2016).

Uma busca por métodos alternativos para a identificação de fungos fez com que pesquisadores desenvolvessem técnicas rápidas, econômicas, não destrutivas e livres de substâncias químicas. Dentre eles, se destaca a espectroscopia no infravermelho próximo (SENTHILKUMAR et al., 2016).

A espectroscopia no Infravermelho Próximo (*Near Infrared Spectroscopy - NIR*), empregada com tecnologia analítica, é capaz de ser aplicada para determinar diversos atributos químicos, físicos e microbiológicos e tem sido utilizada em diversos laboratórios por apresentar uma alta precisão, baixo custo operacional, rapidez, além de ser livre de resíduos químicos, diferentemente das técnicas tradicionais que podem ser bastante dispendiosas, demoradas e com alto consumo de reagentes (GONTIJO NETO et al., 2012; ALMEIDA et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016; PASQUINI, 2018).

Como técnica, ela compreende a interação de ondas eletromagnéticas na faixa de 780 a 2500nm, com a matéria gerando uma resposta espectral característica do modo de medida (OLIVEIRA et al., 2015; GUIMARÃES, 2016).

As absorções na região do NIR ocorrem principalmente devido às bandas sobretons e combinações de vibrações moleculares fundamentais entre as ligações X-H (X=C,N,O,S), (PASQUINI, 2018). A quantificação de analitos utilizando a técnica do NIR é possível quando associada com métodos de calibração multivariada (ALMEIDA et al., 2015).

3.5.1 Imagem Hiperespectral de Infravermelho Próximo (HSI – NIR)

O desenvolvimento da técnica de imagem espectral de infravermelho próximo é uma evolução na área de análises de alimentos, sendo um método rápido e livre de produtos químicos (SENTHILKUMAR et al., 2016). Esse método tem sido usado, cada vez mais, na identificação e detecção de fungos patogênicos e micotoxinas em alimentos (WILLIAMS et al., 2012d; CHU et al., 2018). A tecnologia HSI-NIR é capaz de fornecer dados espectrais e espaciais, oferecendo medições da amostra inteira e incorporando a localização, por exemplo, do contaminante (WILLIAMS et al., 2012d; SENTHILKUMAR et al., 2016).

A tecnologia HSI-NIR é um sistema analítico e foi utilizado pela primeira vez por Goetz et al. (1985) em um levantamento da superfície da Terra, através de técnicas de sensoriamento remoto e que, posteriormente, foi implantado em diversos campos, principalmente na área agrícola (WILLIAMS et al., 2012; BEZUIDENHOUT, 2018). Essa técnica espectroscópica conjuga imagem (espacial, plano x e y) e espectroscopia (espectral, z), formando imagens tridimensionais que podem apresentar mais de 100 comprimentos de ondas distintos representando o espectro NIR em uma faixa pré-selecionada (WILLIAMS et al., 2012; BEZUIDENHOUT, 2018).

A imagem é formada pela refletância da luz através da amostra criando um sistema tridimensional de cubos de dados, chamados hipercubos, que apresentam duas dimensões espaciais (X e Y) e uma dimensão espectral (λ) (Figura 2) (BURGUER & GELADI, 2005; HUANG et al., 2014). Cada imagem é formada por um conjunto de pontos conhecidos por pixels e quanto maior a quantidade de pixels em uma determinada área, maior será a resolução dessa imagem.

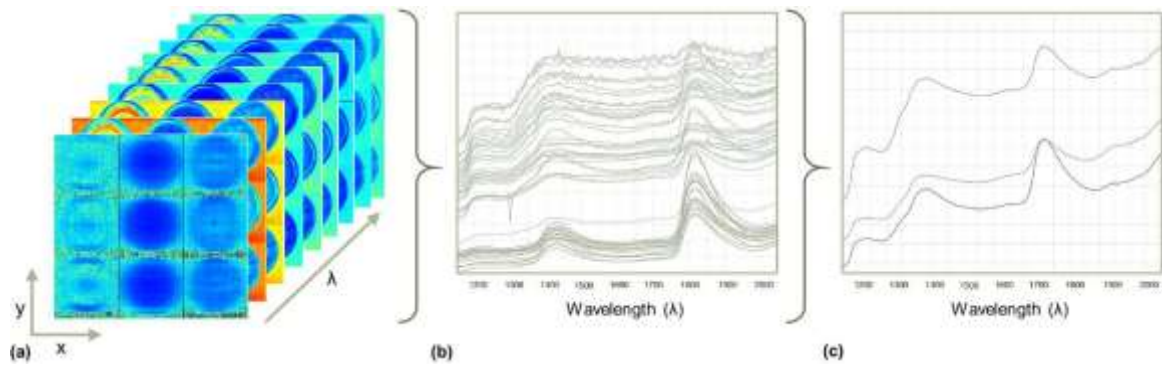


Figura 2-Sistema tridimensional de cubos de dados. a) Uma HSI – NIR é um cubo de dados que consiste em duas dimensões espaciais (X e Y) e uma espectral (λ), onde cada pixel no intervalo da amostra pode ser representado como (b) espectros da região NIR do espectro eletromagnético. c) Os espectros podem ser representados como espectros médios de um objeto na imagem. Fonte: BEZUIDENHOUT, 2018.

O cubo de dados pode ser visto como uma série de espectros (um em cada pixel) ou como uma linha de imagens (uma para cada λ). A seleção de um único pixel (com coordenada x, y) ao longo da dimensão Z irá mostrar o espectro gravado nesta localização espacial específica. A dimensão espectral representa uma impressão digital da amostra, cada pixel está relacionado a um espectro que atua como uma assinatura única de uma amostra que permite associar os constituintes do material e classificar os componentes presentes em uma amostra (WILLIAMS et al., 2012; BEZUIDENHOUT, 2018).

A análise com a tecnologia HSI-NIR baseia-se em quatro etapas para obtenção e processamento dos dados: i) aquisição das imagens, ii) pré-processamento dos dados, iii) análise de imagem multivariada e iv) predição, conforme Figura 3 (DORREPAAL et al., 2016).

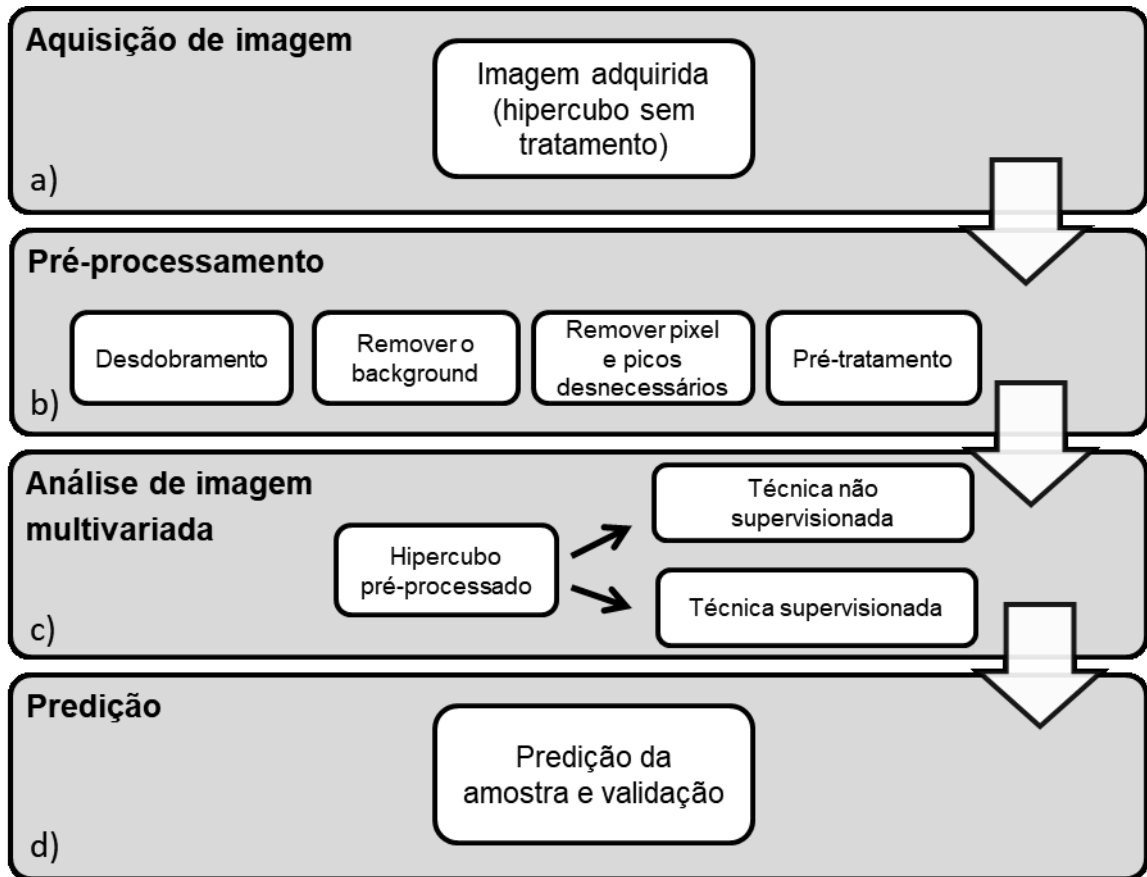


Figura 3—Etapas do processamento de imagem do HSI-NIR. a) Aquisição de imagem multivariada. b) Pré-processamento dos dados. c) Análise da imagem. d) Predição da amostra. Fonte: Adaptado de DORREPAAL et al. (2016).

3.5.1.1 Aquisição de imagem

A forma de obtenção dos espectros nos equipamentos de imagens hiperespectrais é muito semelhante aos espectrômetros convencionais. O sistema de HSI é baseado na instrumentação básica que se faz importante na aquisição das imagens de forma que as mesmas se apresentem confiáveis e com alta qualidade (WU et al., 2013). A instrumentação básica compreende: uma fonte de luz; monocromador, o sistema de filtragem; detector e um software de controle.

3.5.1.1.1 Fonte de Luz

Existem dois tipos de configurações de luz para obtenção das imagens: reflectância e transmitância. Na reflectância, a fonte de luz está acima da amostra e a luz é então refletida da superfície da amostra em direção à câmera, enquanto na transmitância, a luz passa através da amostra, em que a fonte de luz se encontra sob a amostra (BURGUER, 2006).

3.5.1.1.2 Monocromador

É considerado o núcleo do arranjo de dispersão de luz, pois permite selecionar e separar comprimentos de onda, além de relacionar-se com a sensibilidade, implementação e transferência de calibração da imagem final (BEZUIDENHOUT, 2018).

3.5.1.1.3 Detector

Existem três detectores: telureto de mercúrio-cádmio (MCT), sulfeto de chumbo (PbS) ou arseneto de índio-gálio (InGaAs), que são sensíveis na região NIR de 1100 - 2600 nm. As câmeras comerciais de um sistema HSI possui um desses detectores (GOWEN et al., 2007; BOLDRINI et al., 2012).

3.5.1.1.4 Configurações da Câmera

Existem três configurações básicas de câmera que são capazes de controlar as posições ou medir a amostra através do espectrômetro; essas configurações são utilizadas para obtenção de um hiper cubo (BEZUIDENHOUT, 2018).

“Whiskbroom” – a amostra é coletada ponto a ponto, apresenta uma alta resolução espacial de espectro. Um pixel é fotografado de cada vez, ou seja, um espectro é coletado em uma única localização espacial e isso se repete até que todos os pontos da amostra sejam obtidos (MANLEY, 2014; BEZUIDENHOUT, 2018).

“Pushbroom” - é uma das configurações mais usadas. São adquiridas imagens inteiras consecutivamente. O sistema visualiza uma linha inteira de pixels de uma vez por meio do movimento entre a amostra e o detector (GOWEN et al., 2015). É geralmente usado nas imagens hiperespectrais Vis-NIR e SWIR e é mais rápido que a varredura de pontos, porém, mudanças podem ocorrer nas amostras devido ao tempo necessário para coletar os comprimentos de onda (MANLEY, 2014).

“Stare down” – é o sistema que recolhe uma sequência de imagens de toda a amostra, sendo um comprimento de onda de cada vez. Nessa configuração a amostra não é reposicionada para imagens adicionais (GOWEN et al., 2015).

3.5.1.2 Técnicas de pré-processamento

As imagens hiperespectrais apresentam pixels, ruído e informações de segundo plano que podem ser indesejados. As técnicas de pré-processamento ou pré-tratamento são responsáveis pela remoção dessas características, ressaltando as informações químicas das amostras (AMIGO et al., 2013; MANLEY, 2014). A aplicação de um pré-processamento possibilita uma melhora na análise dos dados, como por exemplo, na análise exploratória, na calibração e desenvolvimento de uma modelagem de classificação (MANLEY, 2014).

Os métodos de pré-processamento mais comuns, como revisado por Rinnan et al. (2009), incluem aqueles de normalização, derivadas, correção multiplicativa do sinal (*Multiplicative Scatter Correction* – MSC) e variação normal do sinal (*Standard Normal Variate* – SNV). Dentre esses métodos, os pré-processamentos MSC, SNV e derivadas são os mais conhecidos por terem capacidade de corrigir distorções espectrais, como o espalhamento de luz e deslocamentos de linha de base.

3.5.1.3 Análise Multivariada de Imagem

Uma imagem hiperespectral compreende uma quantidade enorme de dados de uma amostra e pode consistir em até 200.000 espectros gerando um problema para a análise desses dados. Nesse aspecto, a técnica de análise multivariada de imagens (*Multivariate Image Analysis* - MIA) se faz necessária para explorar e reduzir a grande quantidade de dados (MANLEY, 2014; BEZUIDENHOUT, 2018).

Vários algoritmos podem ser usados para facilitar esse processo e extrair as informações úteis de um determinado conjunto de dados, para fins de classificação, por exemplo.

A classificação envolve a tentativa de utilizar as medidas de um conjunto de amostras e verificar se existe relação entre algumas propriedades das amostras e os dados analíticos. Em seguida, recorre-se a um modelo matemático, que após ser construído, é utilizado para determinar a origem de uma amostra desconhecida. A classificação envolve determinar se uma amostra pertence a um ou mais grupos predeterminados. Estes métodos são chamados supervisionados,

pois eles exigem algum tipo de informação prévia sobre a origem das amostras utilizadas para construir o modelo, ao contrário dos não supervisionados, tais como a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis – PCA*) (BURGER, 2006, BEZUIDENHOUT, 2018).

3.5.1.3.1 Abordagem de análise

A análise multivariada de imagem inclui dois tipos de abordagens diferentes, por pixel e por objeto, que se distinguem pelo número de dados (espectros) utilizados durante os cálculos (KUCHERYAVSKIY, 2013; WILLIAMS & KUCHERYAVSKIY, 2016).

O método por objeto agrupa os pixels de uma imagem em clusters separados, utilizando a média dos espectros como um ponto de dados, em comparação com a abordagem por pixels em que cada pixel representa um ponto de dados com um espectro (KUCHERYAVSKIY, 2013).

3.5.1.3.2 Métodos não supervisionados

A PCA é uma das técnicas não supervisionadas mais conhecidas e versáteis utilizada para a análise de vários conjuntos de dados. Esse método é normalmente utilizado antes de outras técnicas multivariadas a serem aplicadas, uma vez que tem a capacidade de mostrar as principais fontes de variabilidade e distribuição de elementos em uma única imagem (GOWEN et al., 2007; AMIGO et al., 2013).

3.5.1.3.3 Métodos supervisionados

A regressão e a classificação são métodos supervisionados, em que a principal diferença entre eles está no formato da variável de saída. Na classificação, uma variável é classificada com base em uma categoria pré-determinada, enquanto os métodos de regressão geram um valor real como uma variável de saída.

Alguns dos métodos de regressão incluem: regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares Regression - PLSR*), regressão por componentes principais (*Principal Component Regression - PCR*) e regressão linear múltipla (*Multiple Linear Regression - MLR*) (WILLIAMS, 2013).

Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares Discriminant Analysis* -PLS-DA) e análise discriminante linear (*Linear Discriminant Analysis* - LDA) são dois métodos de classificação, frequentemente utilizados nas análises de imagens hiperespectrais. Os métodos de classificação identificam os objetos presentes em uma amostra, com base em suas principais características com a maior similaridade, utilizando estratégias supervisionadas (BEZUIDENHOUT, 2018).

3.5.1.4 Predição e Validação

A predição e validação são as últimas etapas de um processo MIA utilizando HSI-NIR. Ao construir um modelo de classificação existe a necessidade de avaliar a sua habilidade preditiva. Frequentemente, diversos autores recorrem ao uso de parâmetros como: taxa de classificação correta, sensibilidade e especificidade. Todos esses parâmetros podem ser determinados utilizando a matriz de confusão (LAVINE, 2009).

Usando uma nova imagem ou uma parte dos dados que não foram analisados anteriormente, os modelos de classificação podem ser validados e amostras desconhecidas podem ser previstas utilizando os modelos desenvolvidos (BEZUIDENHOUT, 2018).

3.5.2 Aplicações da técnica HSI-NIR na classificação de fungos

Os trabalhos com aplicação do método de Imagem Hiperespectral de Infravermelho Próximo para identificação e classificação de fungos toxigênicos encontrados na literatura são descritos a seguir.

Del Fiore et al. (2010) utilizaram a técnica de HSI-NIR a fim de detectar fungos toxigênicos em grãos de milho. Foram utilizadas cepas de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. niger*), *Fusarium* (*F. graminearum* e *F. verticillioides*) e *Penicillium*, que foram inoculadas em grãos de milho a 30 °C. O sistema HSI-NIR (na faixa de 400 – 1000 nm) permitiu a detecção precoce de contaminantes fúngicos no milho a partir de 48h da inoculação e incubação para *A. flavus* e *A. niger*. Os resultados mostram que a imagem hiperespectral é capaz de discriminar rapidamente grãos de milho comerciais infectados com fungos toxigênicos

quando os métodos tradicionais ainda não são eficazes. A discriminação entre as diferentes espécies de fungos foi possível usando PCA e análise discriminante (DA). No entanto, a utilização de placas de Petri plásticas, que é conhecido por absorver na região NIR, poderia interferir potencialmente nos espectros fúngicos obtidos de um sistema HSI-NIR.

Chu et al. (2018) investigaram o potencial da imagem hiperespectral para identificar características de dois fungos produtores de aflatoxina, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. As amostras foram avaliadas pelo método durante seis dias e as imagens hiperespectrais foram realizadas diariamente. Pelo método HSI-NIR foi possível separar e identificar as amostras de *A. flavus* e *A. parasiticus* no 1º dia de avaliação, com a taxa da classificação de 83,33% e 98,15%, respectivamente.

Um estudo anterior realizado por Yao et al. (2008) também mostrou que a diferenciação dos fungos toxigênicos *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus* spp., *Penicillium chrysogenum* e *Trichoderma viride* foi possível no meio de cultura batata–dextrose-ágar (BDA), usando HSI-NIR. O estudo, no entanto, concentrou-se em isolados fúngicos de espécies muito diferentes que não estavam ligadas a uma cultura alimentar específica, mas sim a patógenos alimentares em geral. Posteriormente, Yao et al. (2013) investigaram a diferenciação da infecção por *Aspergillus flavus* em grãos de milho como matriz. Verificou-se que a presença de infecção por *A. flavus* foi muito baixa, <100 ppb, para produzir boa precisão de classificação, embora amostras com >100 ppb tenham apresentado resultados promissores.

Em estudo realizado por Kimuli et al. (2018) foi aplicado o método HSI-NIR para avaliar as características de crescimento de uma cultura mista de *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. glaucus* e *Penicillium* sendo imagens desses fungos registradas durante seis dias. Foi observado, de acordo com as imagens capturadas, que *A. niger* apresentou crescimento rápido, sobressaindo aos dos outros fungos, sendo o resultado obtido através da classificação dos fungos pelo método de HSI-NIR.

Estudo realizado por Aires et al. (2018) descreveu um novo método HSI – NIR para classificar com precisão e rapidez dois agentes etiológicos do algodão, de difícil identificação: *Colletotrichum gossypii* (CG) e *C. gossypii* var. *cefalosporioides* (CGC). Foram utilizadas cinco cepas de CG e 46 de CGC

isoladas de plantas e sementes de algodão doentes; os fungos foram incubados por 15 dias a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas e, após esse período, foram capturadas as imagens das amostras. O método HSI-NIR combinado, com o modelo de classificação SIMCA se mostrou eficiente para a identificação rápida, automatizada e não destrutiva resultando na classificação de várias cepas de fungos CG e CGC, com 95% de nível de confiança.

Williams et al. (2012a) utilizaram a tecnologia de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo (NIR) para diferenciar três espécies de *Fusarium* (*F. subglutinans*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides*) após 72 ou 96 horas de incubação. De acordo com o trabalho foi possível distinguir as espécies de *Fusarium* e os resultados do PLS-DA mostraram uma precisão de classificação entre 16 e 47% de pixels corretamente previstos para *F. verticillioides*, 78 e 100% para *F. subglutinans* e 60 e 80% para *F. proliferatum*.

Outro estudo realizado por Williams et al. (2012b) avaliou o desenvolvimento fúngico de *Fusarium verticillioides* em grãos de milho em que, aplicando os métodos PCA e PLSR sem pré-processamento, foi possível acompanhar o desenvolvimento das amostras fúngicas ao longo do tempo. Williams et al. (2012c) avaliaram o crescimento de três espécies de *Fusarium*. As imagens das colônias foram capturadas em intervalos regulares após a inoculação até 55 horas. O HSI-NIR, combinado com a análise multivariada de imagem (MIA), permitiu visualizar o crescimento fúngico. Dessa maneira foi possível concluir que esse sistema é uma ferramenta poderosa para a avaliação das características de crescimento de fungos.

Bezuidenhout et al. (2018), realizaram um estudo utilizando imagem hiperespectral do infravermelho próximo (HSI-NIR) como uma ferramenta de triagem rápida para distinguir patógenos fúngicos no laboratório. Este estudo concentrou-se em determinar a possibilidade de diferenciar os principais agentes patogênicos da podridão da espiga do milho. Os isolados fúngicos de quatro patógenos, comumente associados ao grão de milho, *Fusarium verticillioides*, *F. graminearum* s.s., *F. boothii* e *Stenocarpella maydis*, foram semeados em meio BDA, em triplicata, e incubados a 25 °C por cinco dias. As imagens foram coletadas na faixa de 1000-2500 nm. Dois modelos de classificação (pixel e objeto) foram comparados para determinar o melhor modelo. A partir do modelo de classificação foi possível diferenciar todos os patógenos após o 5º dia de

crescimento. A classificação por objeto mostrou-se mais eficaz na distinção dos patógenos, com uma precisão média de 93,75%. A tecnologia de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo permite, assim, distinguir com precisão os principais patógenos da podridão da espiga do milho.

3.5.3 Aplicações da técnica HSI-NIR para quantificação de micotoxinas

Na literatura são encontrados trabalhos científicos, os quais reportam aplicações da tecnologia de imagens hiperespectrais em abordagens e problemas específicos.

Senthilkumar et al. (2017) utilizaram a técnica de HSI-NIR para detectar cinco níveis de concentração de ocratoxina em grãos de trigo contaminados artificialmente, utilizando duas cepas diferentes de *Penicillium verrucosum*. O modelo de classificação com o método PCA e dados espectrais com recursos estatísticos obteve 100% de precisão, distinguindo os cinco níveis de concentração de grãos de trigo contaminados por ocratoxina e, também níveis de infecção dos grãos inoculados com *P. verrucosum* com precisão acima de 98%, além de distinguir grãos saudáveis, contaminados com OTA e infectados com *P. verrucosum*.

Estudo realizado por Femenias et al. (2020) teve como objetivo padronizar um método para classificação de amostras e quantificação de desoxinivalenol (DON) em grãos de trigo naturalmente contaminados. Utilizando como referência o método de análises por CLAE, o modelo de classificação utilizou PLS e obteve um RMSEP de $405 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $1174 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para um modelo de validação cruzada e um por conjunto independente, respectivamente, e uma precisão de 62,7%. Os resultados não se apresentaram extremamente precisos para quantificação de DON, mas promissor para pesquisas subsequentes.

Femenias et al. (2021) avaliaram HSI-NIR para detectar DON em trigo, em que todos os espectros foram pré-tratados e processados por PLS e LDA, com RMSEP de $501 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para DON, e precisão de 85,4% para o conjunto de validação.

Wang et al. (2014) avaliaram o potencial do HSI-NIR para detecção de contaminantes de aflatoxina B1 (AFB1) em grãos de milho. Os grãos foram contaminados artificialmente, com diferentes concentrações (10, 20, 100 e 500

ppb) e aplicadas na superfície dos grãos. Com base no modelo de PCA e análise fatorial discriminante (FDA) o modelo de classificação obteve uma precisão de 88%, mostrando-se eficiente para detectar níveis de AFB1 mesmo em concentrações baixas, como 10 ppb, quando aplicadas na superfície dos grãos. Kimuli et al. (2018) realizaram trabalho parecido com a aplicação de concentrações de AFB1 (10, 20, 100 e 500 ppb) na superfície de 600 grãos de milho, e os resultados com PCA apresentou acima de 96% de precisão.

Outro estudo realizado por Wang et al. (2015) objetivou detectar, através da técnica de HSI-NIR, AFB1 em grãos de milho inoculados com *Aspergillus flavus* ainda no campo. Com a análise de PCA seguida de PCA inversa e secundária, foi possível identificar a contaminação por AFB1, com precisão de 100%, o método foi comparado com a análise química do Aflatest®. Foram realizados testes de verificação de reprodutibilidade do método utilizado e a precisão de detecção atingiu 92,3%, mostrando a eficiência da técnica HSI-NIR para detectar aflatoxina, inoculada artificialmente no campo, em grãos de milho.

Chu et al. (2017) utilizaram a técnica HSI-NIR para detectar AFB1 em 124 grãos de milho de quatro variedades contaminados artificialmente no campo com *Aspergillus flavus*. Foram aplicadas a normalização e a análise de componentes principais (PCA) para classificar qualitativamente os níveis de contaminação em <20, 20 e 100 ppb, os modelos de calibração e validação obtiveram precisão de 83,75% e 82,50%, respectivamente. Os resultados indicaram que a técnica de HSI-NIR pode ser usada para classificar qualitativamente AFB1 em grãos de milho.

Trabalho realizado por Zhu et al. (2015) com grãos de milho contaminados artificialmente com *A. flavus* teve como objetivo determinar a concentração de aflatoxinas através da técnica HSI-NIR. Análises dos espectros médios foram avaliadas com PCA apresentando precisão de 90% para o conjunto de testes, quando utilizada a imagem hiperespectral a precisão foi de 80%, embora apresente uma precisão menor do que a de espectros médios, a técnica de HSI-NIR se mostrou promissora na detecção de aflatoxinas.

O estudo de Kandpal et al. (2015) também avaliou a contaminação de grãos de milho por aflatoxinas através de HSI-NIR. Grãos de milho foram inoculados com a micotoxina em níveis de 10, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Com o

modelo PLS-DA foi possível detectar as amostras contaminadas com precisão de 96,9%.

Tekle et al. (2015) testaram a técnica HSI-NIR para detectar DON em grãos de aveia, que previamente foram analisados por um método referência. Foi ajustado o modelo de calibração PLSR por validação cruzada e realizada a previsão de valores de DON. De acordo com Tekle et al (2015) os resultados mostraram que o HSI-NIR tem potencial e é promissor para modelos de análises de rotina.

Trabalho realizado por Parrag et al. (2020) avaliaram a contaminação natural e artificial de amostras de fubá com *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides* e *Fusarium culmorum*, as imagens das amostras de fubá foram pré-tratadas usando o método de Savitzky-Golay e variação normal do sinal (SNV). Nos espectros, foi utilizado o algoritmo PLS-DA de acordo com o nível de contaminação e o método de PLSR para prever a contaminação de DON das amostras e a contaminação de toxinas: a soma das fumonisinas (FB1, FB2) e de DON das amostras. Com base nos resultados promissores do estudo, a HSI tem potencial para ser usado como um método de teste preliminar para o teor de micotoxinas em matérias-primas para rações.

3.6 Métodos alternativos naturais no controle de fungos produtores de micotoxinas

Com o objetivo de reduzir a contaminação fúngica em alimentos, os métodos químicos para o controle de fungos na agricultura são utilizados como uma forma de proteção para as culturas vegetais (SCHURT et al., 2017). Alguns produtos químicos são utilizados como inibidores fúngicos como, a amônia, a solução de peróxido de hidrogênio, o hidróxido de cálcio, o bissulfeto de sódio, o carbonato de sódio, a cal e, outros, sendo os principais dentre estes, os ácidos orgânicos (SIMAS, 2010). Além desses, temos o grupo dos agrotóxicos, que incluem os inseticidas, herbicidas e fungicidas, dentre outros. De acordo com a FAO (2017), no Brasil em 2015, foram utilizadas 395.646 toneladas de agrotóxicos, sendo 66 mil de fungicidas. Os fungicidas podem ser agrupados quimicamente em carboxamidas, triazóis, estrobirulinas e ditiocarbamatos (VILLANI, 2016). No entanto, esses métodos possuem elevados custos e o uso

desenfreado desses produtos químicos oferecem riscos ambientais e toxicológicos, que causam desequilíbrio ecológico e muitos problemas para saúde humana, pois, são substâncias não biodegradáveis, que podem deixar resíduos nas plantas e no ambiente (CABRAL et al., 2013; SCHURT et al., 2017). Nesse contexto, métodos alternativos mais naturais que causem menor impacto no ambiente e na saúde dos animais e humanos têm sido cada vez mais demandados. Nas últimas décadas, 25% das substâncias utilizadas como agentes antifúngicos em todo o mundo foram obtidas de produtos naturais ou seus derivados (SCORZONI et al., 2016). As plantas são a principal fonte de produtos naturais que podem ser explorados quanto ao seu potencial antimicrobiano (SILVA & FERNANDES JÚNIOR, 2010).

Essa busca por compostos naturais que apresentem atividade antifúngica é decorrente da elevada toxicidade dos ingredientes ativos frequentemente associados à terapia antifúngica. Um antifúngico ideal deve apresentar amplo espectro de ação e efeitos mínimos à saúde e ao ambiente. Embora novas moléculas tenham sido descobertas e novas formulações disponibilizadas, permitindo reduzir a toxicidade e aumentar a biodisponibilidade dos ingredientes ativos, a busca por novos agentes antifúngicos mais naturais é sempre desejável.

A fitoterapia tem sido utilizada como uma forma de controle de microrganismos causadores de doenças, método esse, desenvolvido através da utilização de metabólitos secundários produzidos pelas plantas (GOVINDACHARI et al., 2000; SOUZA et al., 2002).

Os taninos e os flavonóides são conhecidos por realizarem várias funções biológicas nas plantas como controle de insetos, fungos e bactérias destacando-se como metabólitos secundários (DEGÁSPARI et al., 2005; PEREIRA et al., 2015). Alguns compostos naturais como, óleos essenciais, flavonóides, alcalóides, proteínas, peptídeos, glicoproteínas e taninos são encontrados em diversos vegetais e podem ser aplicados na construção de novos compostos antimicrobianos (SATYA et al., 2005; NEWMAN E CRAGG, 2007).

Os compostos fenólicos têm sido considerados entre os mais importantes e numerosos grupos de substâncias pertencentes aos vegetais. Esses compostos são encontrados com estruturas variadas como os taninos, os ácidos fenólicos e os flavonóides (CHUNG et al., 1998; NACZK & SHAHIDI, 2004).

Os compostos fenólicos são fitoquímicos que podem ser encontrados em cereais, frutas, chocolate, ervas, café, vinho e outros, e apresentam diversas funcionalidades como, agentes antimicrobianos, antioxidantes, antitrombocíticos, cardioprotetores e vasodilatadores (ARAUJO, 2011; VICHAPONG et al., 2010).

O efeito inibitório de compostos fenólicos na germinação de esporos, crescimento micelial e produção/atividade de enzimas microbianas varia entre os diferentes grupos de fenóis. Dessa forma, esses compostos podem estar envolvidos nos mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência aos fungos em plantas (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992; NICHOLSON, 1995). Nesse sentido, Arbos et al. (2013) avaliaram as atividades antimicrobiana e antioxidante de compostos fenólicos de dois extratos: um obtido da casca e outro da amêndoa de manga variedade 'Tommy Atkins' no desenvolvimento de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* tendo demonstrado eficiência na inibição destas bactérias. De Gáspari et al. (2005) analisaram a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos obtidos de frutos da *Schinus terebenthifolius* ou aroeira-vermelha, em *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, sendo os resultados semelhantes ao encontrado por Arbos e colaboradores (2013).

Borrás-Linares et al. (2015) relataram o perfil fitoquímico (fenólicos, flavonóides e antocianinas), a capacidade antioxidante e a atividade antibacteriana dos extratos etanólicos de uma coleção de 25 variedades de *Hibiscus sabdariffa* (Hs) mexicanas, com diferentes intensidades de cor de cálice, variando de verde-amarelo a vermelho profundo, cultivadas na mesma condição. Uma grande variedade de compostos fenólicos foi identificada nos diferentes extratos, principalmente ácidos fenólicos, flavonóides e antocianidina. A atividade antibacteriana dos extratos de Hs foi testada contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*. Os extratos etanólicos foram efetivos contra todas as cepas bacterianas testadas, demonstrando um efeito maior contra bactérias Gram-positivas.

Os grãos de sorgo, além de nutritivos, possuem, também, altos teores de compostos fenólicos como, taninos, ácidos fenólicos, antocianinas, entre outros, principalmente no pericarpo. Kil et al. (2009) relataram as atividades antioxidantes e antimicrobianas de extratos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) preparados a partir de 25 cultivares da Coréia do Sul em *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella*

typhimurium, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Bacillus subtilis*. Os compostos fenólicos foram extraídos com metanol e, posteriormente, fracionados com hexano, acetato de etila (EtOAc), *n*-butanol (BuOH) e água. Os extratos de metanol apresentaram maiores níveis de atividade antimicrobiana do que as demais frações. Os resultados indicaram que os extratos de sorgo podem ser usados como fonte de compostos antioxidantes e antimicrobianos na indústria de alimentos. Entretanto, existem poucos trabalhos sobre esse efeito em fungos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Utilizar a tecnologia de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo e técnicas de análise multivariada de imagens para desenvolver um método para classificação de fungos do gênero *Fusarium* e quantificação de fumonisinas, bem como analisar a atividade antifúngica de compostos fenólicos obtidos de grãos de sorgo sobre desenvolvimento de fungos fitopatogênicos.

CAPÍTULO I: APLICAÇÃO DA TÉCNICA HSI-NIR ASSOCIADA À ANÁLISE MULTIVARIADA PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS TOXIGÊNICOS DAS ESPÉCIES *Fusarium verticillioides* E *F. graminearum*

4.2 Objetivos específicos

- Selecionar amostras de *Fusarium* spp. isolados de grãos de sorgo e milho.
- Realizar a análise molecular de isolados de *Fusarium* spp.
- Desenvolver modelos de classificação utilizando a tecnologia HSI-NIR para identificação de fungos toxigênicos das espécies *Fusarium verticillioides* e *F. graminearum*;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Classificação de *Fusarium* spp.

5.1.1 Seleção das amostras

Nesse estudo foram utilizadas 15 amostras de duas espécies do gênero *Fusarium*, isolados de grãos de sorgo e de milho provenientes dos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Paraná, Roraima e Santa Catarina. As amostras de fungos foram obtidas da Coleção Micológica de Lavras (UFLA) e da Embrapa Milho e Sorgo (Tabela 2), cujos dados constam na plataforma Alelomicro.

Tabela 2 – Isolados de *Fusarium* spp.

Isolado	Espécie	Município	Substrato
1 BRM32977	<i>F. verticillioides</i>	Londrina - PR	<i>Zea mays</i>
2 BRM35317	<i>F. verticillioides</i>	Luís Eduardo Magalhães - BA	<i>Zea mays</i>
3 BRM35319	<i>F. verticillioides</i>	Luís Eduardo Magalhães - BA	<i>Zea mays</i>
4 BRM35329	<i>F. verticillioides</i>	Campos Novos - SC	<i>Zea mays</i>
5 BRM35345	<i>F. verticillioides</i>	Boa Vista - RR	<i>Zea mays</i>
6 BRM35388	<i>F. verticillioides</i>	Sinop - MT	<i>Zea mays</i>
7 BRM35391	<i>F. verticillioides</i>	Sinop - MT	<i>Zea mays</i>
8 BRM35412	<i>F. verticillioides</i>	Belém - PA	<i>Zea mays</i>
9 CML 2743	<i>F. verticillioides</i>	Sete Lagoas - MG	<i>Sorghum bicolor</i>
10 CML 2778	<i>F. verticillioides</i>	Rondonópolis - MT	<i>Sorghum bicolor</i>
11 BRM51204	<i>F. verticillioides</i>	Cascavel - PR	<i>Zea mays</i>
12 BRM51205	<i>F. verticillioides</i>	Mineiros - GO	<i>Zea mays</i>
13 BRM51202	<i>F. graminearum</i>	Campo Mourão - PR	<i>Zea mays</i>
14 BRM51203	<i>F. graminearum</i>	Juranda - PR	<i>Zea mays</i>
15 BRM51206	<i>F. graminearum</i>	Brasilândia do Sul - PR	<i>Zea mays</i>

Nota: Abreviações das coleções de culturas: CFMS – Coleção de Fitopatógenos de Milho e Sorgo, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil; CML – Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

5.1.2 Identificação molecular de *Fusarium* spp.

Os isolados BRM 051202, BRM 051203, BRM 051204, BRM 051205 e BRM 051206 foram selecionados para identificação molecular. Os demais isolados foram previamente identificados como *F. verticillioides* pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras e Laboratório de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo.

Os isolados de *Fusarium* foram cultivados em ágar batata dextrose (BDA) e mantidos em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por aproximadamente sete dias até que o crescimento micelial fosse visível. O DNA genômico total foi extraído usando o método descrito por Doyle e Doyle (1987). A identificação das espécies de *Fusarium* foi realizada utilizando a região conservada do espaçador ribossomal transcrito interno (ITS) dos fungos utilizando os pares de primers universais: verso-ITS5 (5'-GAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), e reverso-ITS4 (5'-CCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). A reação de PCR foi realizada em um Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) com 20 µL de misturas de reação de PCR contendo tampão A 1X (Kapa Biosystems, Wilmington, EUA); MgCl₂ 0,8 mM; 125 µM de cada dNTP; 0,5 µM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polymerase (Kapa Biosystems, Wilmington, EUA) e 20 ng de DNA genômico. O ciclo de amplificação consistia em uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida por 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, e uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos da PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% (p / v), e o DNA amplificado foi purificado com a enzima Exo-Sap (GE HealthCare, Chicago, EUA). As reações de sequenciamento do DNA amplificado por PCR foram realizadas utilizando o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções dos fabricantes, e as sequências de nucleotídeos foram determinadas em um sequenciador automático ABI PRISM 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). As sequências de nucleotídeos foram comparadas com as sequências de nucleotídeos depositadas no banco de dados GenBank em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>., pela Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (ALTSCHUL et al. 1997).

5.1.3 Análise das imagens por HSI-NIR

As análises para classificação dos isolados de *Fusarium* spp. foram realizadas no Laboratório Avançado de Tecnologia Química (LATECQ) e no Laboratório de Fitopatologia, situados na Embrapa Algodão, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

5.1.3.1 Preparo das amostras

Os 15 isolados de *Fusarium* spp. (Figura 4) foram cultivados, em triplicata, em placas de Petri de 60 mm contendo 8 mL de Ágar Czapech (3% w/v sacarose; 0,3% p/v NaNO₃; 0,1% p/v K₂HPO₄; 0,05% p/v MgSO₄•7H₂O; 0,05% p/v KCl e 0,001% FeSO₄•7H₂O p/v) solidificado em 1,5 p/v ágar e incubado por três dias em câmara de crescimento a 25 °C, até que o crescimento radial atingisse 70-90% da área das placas de Petri. As análises fúngicas foram realizadas na Embrapa Algodão (PB - Brasil). Na Figura 4 estão apresentadas as imagens das colônias dos isolados de *Fusarium* utilizados nesse estudo, após 3 dias de crescimento.

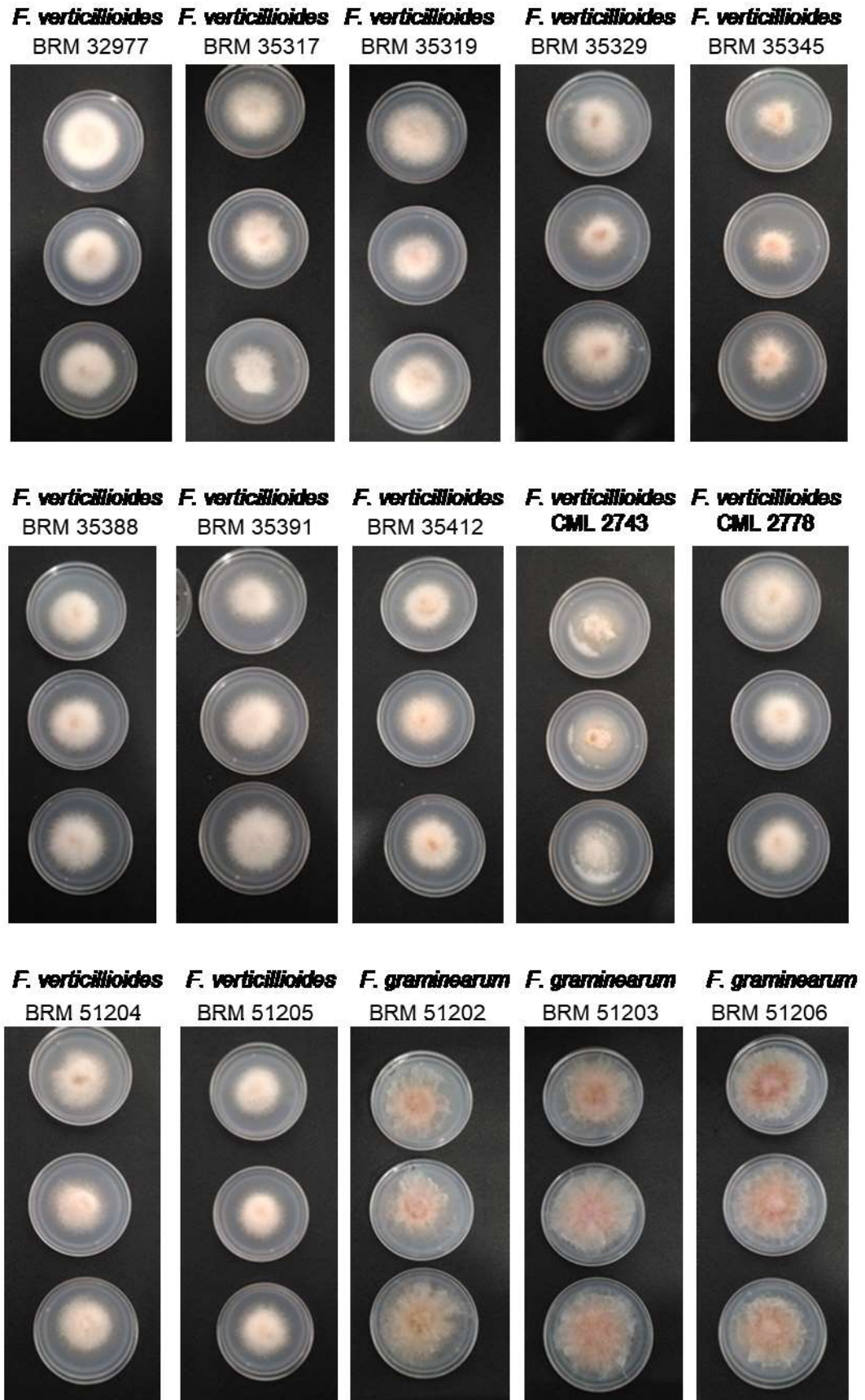


Figura 4– Imagens fotográficas das colônias dos isolados de *Fusarium verticillioides* e *F. graminearum*, após 3 dias de crescimento.

5.1.3.2 Sistema de Imagens Hiperespectrais NIR

As imagens hiperespectrais das colônias dos 15 isolados de *Fusarium* spp. foram obtidas utilizando um espectrômetro sisuChema SWIR-Specim® (Spectral Imaging Ltd, Oulu, Finlândia) em uma faixa espectral de 1000–2500 nm, amostragem espectral de 6,25 nm, resolução espacial de 10nm, tamanho da imagem de 150 × 150 µm, 256 faixas de comprimento de onda, uma câmera de alta performance, com uma lente de 50mm. As intensidades dos sinais foram medidas em cada pixel da imagem e em cada comprimento de onda. Os dados foram obtidos utilizando o software ChemaDAQ (Spectral Imaging Ltd, Oulu, Finlândia).

5.1.3.3 Aquisição e análise multivariada das imagens

A aquisição das imagens HSI-NIR incluiu a digitalização da matriz linear pelo detector ao longo do eixo X e da imagem em movimento pelo eixo Y, formando um hipercubo 3D que contém informações de imagem espectral e espacial, as quais foram utilizadas, posteriormente, para identificar os patógenos. Para a captura das imagens, as placas de Petri foram abertas e as imagens foram salvas no formato “raw” para posterior tratamento.

As imagens hiperespectrais foram analisadas pelo software Prediktera Evince v.2.6.0 (UmBio, Suécia).

Após a aquisição das imagens os espectros foram pré-processados para a remoção de background e de pixels desnecessários (faixa espectral utilizada de 1000-2500nm). Um mosaico com 3 imagens foi formado para a espécie *Fusarium verticillioides* e outro para *Fusarium graminearum* (amostras CML 2778 e BRM 51202), formando assim o conjunto de calibração. As imagens das outras 13 espécies restantes foram utilizadas para os conjuntos de validação externa do modelo.

Diferentes pré-processamentos foram aplicados ao conjunto de dados antes do cálculo da PCA. Os dados foram centrados na média e após, foi aplicado o pré-processamento variação normal padrão (SNV), primeira derivada e SNV seguido de primeira derivada.

A análise exploratória foi realizada com uma PCA calculada utilizando a distribuição por pixel das imagens, e apresentando 3 componentes principais (*Principal componente - PC*).

O modelo PLS-DA foi utilizado para diferenciar as espécies de *Fusarium graminearum* e *F. verticillioides*. Esse modelo visa encontrar uma linha reta que divide os dados em duas regiões formando dois grupos, prevendo qualitativamente um conjunto de variáveis dentro de um conjunto de dados maior. O PLS-DA se baseia no algoritmo: $y=X\beta+f$, em que “X” é hipercubo desdobrado, adquirido a partir da imagem hiperespectral; “ β ” é o coeficiente beta; “f” é o erro residual (MUSUMARRA et al., 2007; AMIGO et al., 2013; BRERETON & LLOYD, 2014; ELMASRY & NAKAUCHI, 2016).

Para a calibração do modelo PLS-DA selecionou-se regiões das três repetições de uma amostra de cada espécie formando um mosaico, de forma que o modelo construído pudesse distinguir as espécies de fungos. As outras 13 amostras de fungos do conjunto teste foram, então, analisadas para identificar a espécie fúngica de acordo com o modelo obtido (por pixel).

Foi considerado como falso negativo o pixel que não se enquadrou em nenhuma classe, sendo denominado “sem classe”. Para calcular a precisão da classificação utilizou-se a equação “a” (Figura 5). Além disso, também foram realizados os cálculos para estimar os erros falso positivo (*false positive - FP*) e falso negativo (*false negative - FN*). As equações estão descritas na Figura 5.

Na Figura 5 encontra-se, também, a equação da sensibilidade do modelo, que se refere à probabilidade da espécie de fungo a ser classificada corretamente no modelo (SOKOLOVA et al., 2006). A especificidade (Figura 5) determina a probabilidade das espécies fúngicas restante serem classificadas corretamente e é também denominada como taxa negativa verdadeira (*true negative - TN*) (BEZUIDENHOUT, 2018). A precisão refere-se a capacidade de predição do modelo, conforme equação da Figura 5. Além desses valores, também foi calculada a taxa de erro de classificação do modelo, o coeficiente de determinação e a raiz quadrada do erro médio de previsão (RMSEP).

$$\begin{aligned} \text{a) Precisão da Classificação (\%)} &= \frac{\text{TP} + \text{TN}}{\text{Total}} \times 100\% \\ \text{b) Erro } \textit{false positive} \text{ (\%)} &= \frac{\text{FP}}{\text{Total}} \times 100\% \\ \text{c) Erro } \textit{false negative} \text{ (\%)} &= \frac{\text{FN}}{\text{Total}} \times 100\% \\ \text{d) Sensibilidade (\%)} &= \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}} \times 100\% \\ \text{e) Especificidade (\%)} &= \frac{\text{TN}}{\text{TN} + \text{FP}} \times 100\% \\ \text{f) Precisão (\%)} &= \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FP}} \times 100\% \\ \text{g) Taxa de erro da Classificação (\%)} &= \frac{\text{FN} + \text{FP}}{\text{Total}} \times 100\% \end{aligned}$$

Figura 5 – Equações para cálculo dos Parâmetros de Classificação do modelo. TP=*True positive*; TN=*True negative*; FP=*False positive*; FN=*False negative*. Fonte: Adaptado de BEZUIDENHOUT (2018).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Identificação molecular de *Fusarium* spp.

A comparação da sequência de nucleotídeos da região ITS dos cinco isolados de *Fusarium* sequenciados neste estudo com sequências de nucleotídeos depositadas no banco de dados GenBank usando o programa Blastn no banco de dados NCBI mostrou que todas as sequências exibem 100% de identidade com *F. verticillioides* (BRM 051204, BRM 051205) e *F. graminearum* (BRM 051202, BRM 051203, BRM 051206) (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação molecular de fungos do gênero *Fusarium* baseada na amplificação e sequenciamento da região ITS.

Amostra	Espécie	Cobertura (%)	E-value	Identidade (%)	Acesso GenBank
BRM51206	<i>F. graminearum</i> ^a	100	0.0	100	MG274308.1
BRM51202	<i>F. graminearum</i> ^a	100	0.0	100	MG274308.1
BRM51203	<i>F. graminearum</i> ^a	100	0.0	100	MG274308.1
BRM51204	<i>F. verticillioides</i> ^a	100	0.0	100	MG274298.1
BRM51205	<i>F. verticillioides</i> ^b	100	0.0	100	MH861171.1

^aWALDER et al., 2017; ^bVU et al., 2017.

6.2 Classificação de *Fusarium* spp. utilizando HSI-NIR

6.2.1 Análise espectral

A análise do conjunto de dados utilizando a técnica de PCA foi realizada após os dados serem centrados na média e realizados o pré-tratamento SNV para eliminação dos efeitos de espalhamento da luz.

Os espectros médios de cada uma das espécies de *Fusarium* utilizada para calibração do modelo foram plotados em um gráfico apresentado na Figura 6.

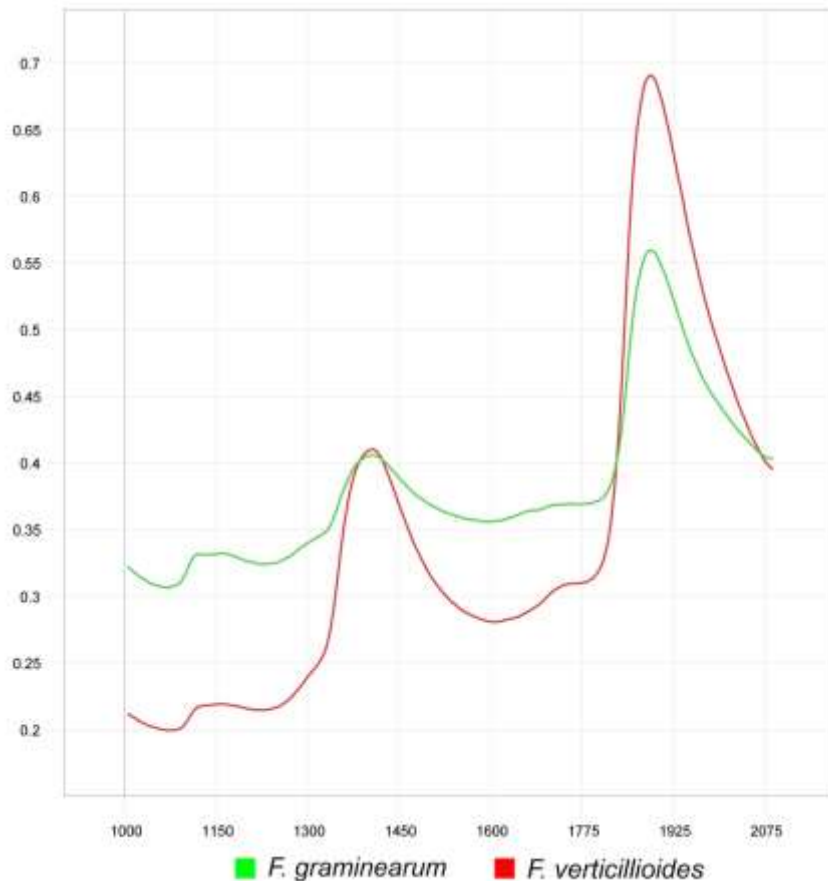


Figura 6 – Espectros médios dos isolados de *Fusarium* utilizados na calibração do modelo de classificação dos fungos. *F. verticillioides* (CML2778) em vermelho e *F. graminearum* (CFMS1347) em verde. Pré-tratamento aplicado: dados centrados na média + SNV.

Os espectros médios das duas espécies de *Fusarium* apresentam bandas de absorvância muito semelhantes, porém com variação de intensidade e perfil espectral. As bandas que apresentam maiores intensidades podem ser visualizadas nos comprimentos de onda 1140, 1418 e 1895 nm. A Figura 6 e a Tabela 4 podem explicar as regiões de absorção, de acordo com a relação dos espectros médios dos isolados com os grupos funcionais atribuídos às bandas de HSI-NIR. A banda de 1140 nm corresponde ao alongamento das ligações CO e CC, ao segundo espectro harmônico CH e COH, COC deformações angulares dos carboidratos da parede celular do fungo (OSBORNE & FEARN, 1986; BERARDO et al., 2005; SANTOS et al., 2012). A banda com pico em 1418 nm foi atribuída ao segundo harmônico CH do carboidrato, e correspondeu ao alongamento simétrico de C = O e COO, deformações angulares dos grupos CH₂ e CH₃ dos ácidos graxos, indicando a presença de amido e sacarose (trecho OH, primeiro harmônico) e nitrogênio que pode ser associado a proteína (trecho NH

primeiro harmônico) (OSBORNE & FEARN, 1986; BERARDO et al., 2005; SANTOS et al., 2012). A banda em 1895 nm referia-se à deformação angular do grupo O-H e do grupo de proteínas CONH (OSBORNE & FEARN, 1986; BERARDO et al., 2005; SANTOS et al., 2012).

Tabela 4- Bandas características no infravermelho atribuídas a espectros do gênero *Fusarium*.

Comprimento de onda (nm)	Descrição do grupo químico aproximado
1140	Segundo harmônico do C-H do carboidrato. Estiramento das ligações C-O, C-C. Deformações angulares de C-O-H, C-O-C de carboidratos presentes na parede celular.
1418	Segundo harmônico do C-H do carboidrato. Deformação angular dos grupos > CH ₂ e CH ₃ dos ácidos graxos. Estiramento simétrico de C=O e COO-. Amina III de proteínas.
1895	Deformação angular do grupo O-H. Grupo CONH da proteína.

Fonte: Adaptado de OSBORNE & FEARN, 1986; BERARDO et al., 2005; SANTOS et al., 2012.

6.2.2 Análise por componentes principais

O modelo PCA, para as três componentes, foi calculado com dados centrados na média e explicou 91,1% da variância do conjunto de dados original. O modelo PCA foi utilizado para explorar os dados por meio de diferenças entre as espécies dos isolados selecionados para o modelo. Os resultados dos modelos, calculados em pixel foram apresentados na Figura 7.

As PC1, PC2 e PC3 foram utilizadas para identificar os pixels desnecessários, que foram removidos para a continuidade da análise e interpretação dos dados. O gráfico e a imagem do modelo (Figura 8) foram utilizados para explorar a diferença entre as espécies de *Fusarium*. Na Figura 7 (d) é possível observar claramente a separação das espécies. O mapa em gradiente de cores ilustra a distinção das espécies de isolados com base nos gráfico de *Score* (Figura 7), em que os valores de *score* positivos são vermelhos e

os valores de *score* negativos são azuis – amarelos, correspondendo às bandas dos gráficos de *Loading*.

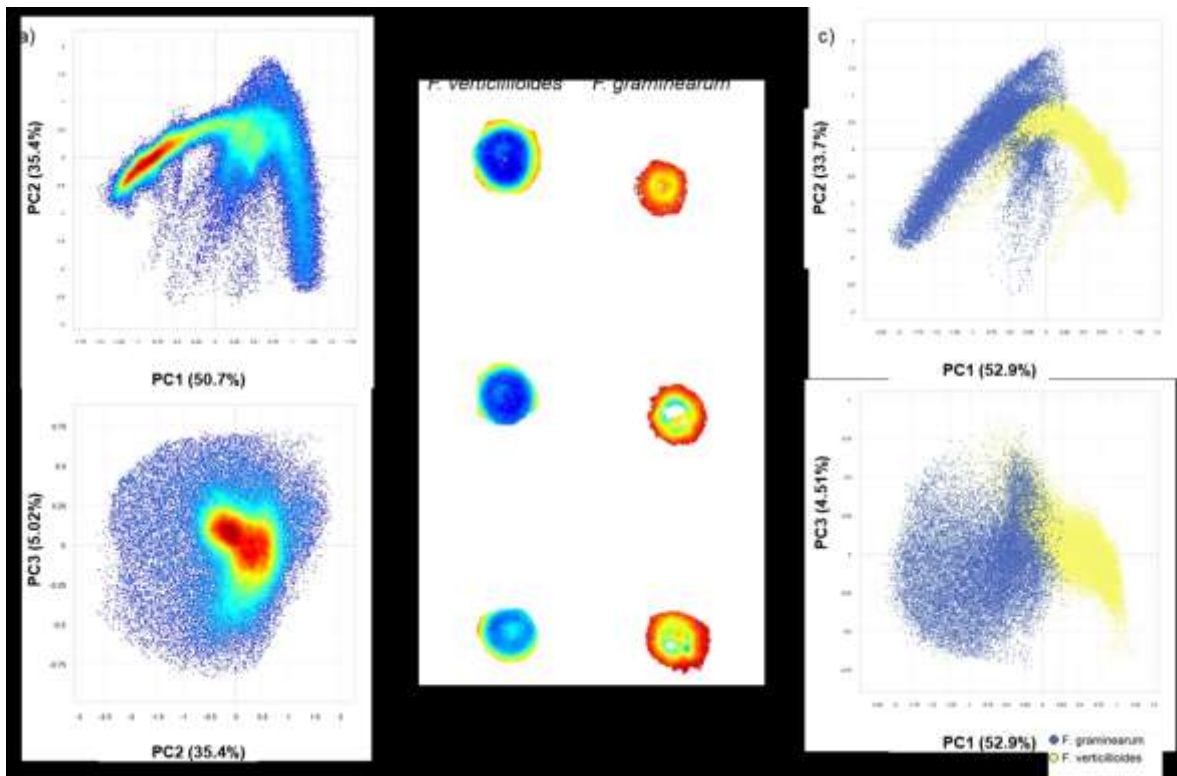


Figura 7 – Modelo PCA por pixel ilustrando a separação entre as espécies. a) Gráfico do PCA do PC1 (50,7%) e PC2 (35,4%); e gráfico do PCA do PC2 (35,4%) e PC3 (5,02%). b) Imagem do PCA com as espécies *Fusarium verticillioides* e *F. graminearum*. c) Gráfico de PCA do PC1 e PC2, e do PC1 e PC3 ilustrando a separação das espécies de *Fusarium*.

Os gráficos de *Loadings* (Figura 8) apresentam as regiões espectrais que contribuíram para a separação das espécies e fornecem explicações possíveis para a variância observada nos gráficos de *score* e nas imagens com base nos pontos espectrais usados durante os cálculos do PC (BEZUIDENHOUT, 2018).

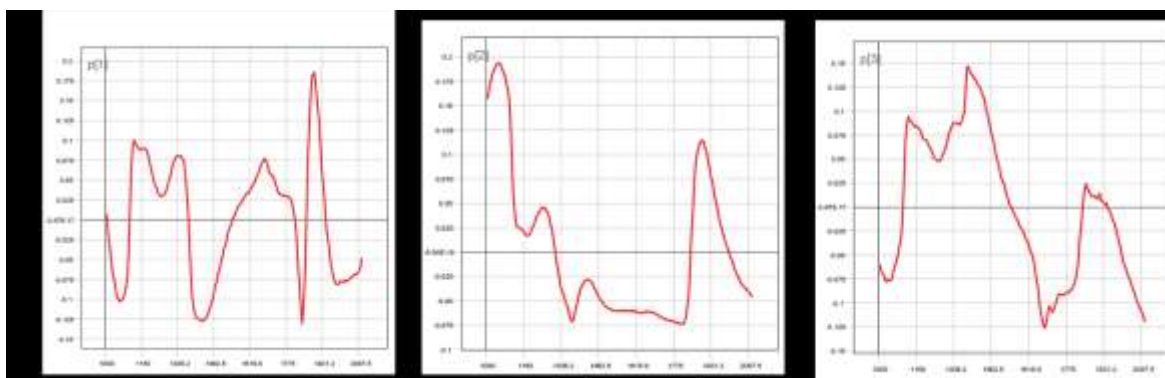


Figura 8 - Gráficos de *Loadings* do PCA do modelo. a) PC1 com bandas em 1056, 1412, 1843 e 1893 nm; b) PC2 com bandas em 1050, 1350 e 1900 nm; e c) PC3 com bandas em 1118, 1368, 1687 e 1862 nm.

No gráfico de Loadings PC1 (Figura 8a) é possível observar bandas negativas intensas em 1056, 1412 e 1843 nm e uma banda positiva em 1893 nm. A banda negativa em 1056nm pode ser atribuída à presença de carboidratos (estiramento do segundo harmônico CH) e compostos carbonílicos (OSBORNE & FEARN, 1986; BERARDO et al., 2005; SANTOS et al., 2012).

No gráfico de PC2, pode-se destacar apenas bandas positivas intensas em 1050, 1350 e 1900 nm. Nesse caso, a relação das bandas 1050 e 1900nm correspondem aos grupos CONH da composição proteica dos isolados e a banda espectral de 1350 nm foi associada aos carboidratos (OSBORNE & FEARN, 1986; BERARDO et al., 2005; SANTOS et al., 2012). No entanto, as bandas espectrais de 1895 a 1900 (Figura 8b) indicam a presença de umidade nas amostras (extensão OH, combinação de deformação OH) e podem interferir na identificação e serem relevantes como atributos de modelo seja de classificação ou de calibração da amostra.

O gráfico de loading da PC3 mostrou três bandas positivas em 1118, 1368 e 1862 nm e uma banda negativa em 1687 nm. Assim como na PC2, a PC3 também apresentou bandas relacionadas com ligações com o grupo CONH e OH.

De acordo com Berardo et al. (2005), a separação de *F. verticillioides* e *F. graminearum* pode estar relacionada à banda negativa de 1412 nm apresentada em PC1, que corresponde às vibrações harmônicas secundárias atribuídas seja a amido ou a presença de lipídios e OH, enquanto a banda espectral de 1843 nm está associada às bandas de primeiro sobreton de HN, associado a presença de compostos nitrogenados, como proteínas e enzimas.

6.2.3 Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA)

Depois que os dados originais foram adquiridos, eles foram centralizados na média e pré-processados usando a técnica SNV, que apresentou melhores resultados ao testar os três pré-processamento a seguir: 1- SNV, 2- primeira derivada e 3- SNV + primeira derivada, conforme apresentado na Tabela 5. O número de variáveis latentes (VL) foi determinado em função do RMSEP que apresentou o melhor resultado de classificação das espécies pelo modelo. Verificou-se que o pré-tratamento SNV utilizando quatro variáveis latentes (VL) apresentou o melhor resultado, explicando 92,41% da variância e R^2 0,92 para a classificação das espécies de *Fusarium*, enquanto os pré-tratamentos de primeira derivada e SNV+1ªDerivada apresentaram variância explicada e R^2 de 72,48% (R^2 0,83) e 21,43% (R^2 0,90), respectivamente.

Tabela 5 – Análise comparativa da aplicação de pré-tratamento ao conjunto de dados para classificação das espécies (% , pixel) no modelo PLS-DA.

Amostras	Pré-tratamentos			
	SNV	DERIVADA	SNV+DERIVADA	
<i>F. verticillioides</i>	BRM 32977	98,3	76,0	99,6
	BRM 35317	99,9	95,1	99,9
	BRM 35319	100,0	92,6	100,0
	BRM 35329	93,6	87,8	97,6
	BRM 35345	88,0	70,1	94,9
	BRM 35388	99,9	99,4	100,0
	BRM 35391	100,0	95,0	100,0
	BRM 35412	96,7	89,1	97,8
	CML 2743	98,2	89,2	99,9
	BRM 51204	97,9	87,5	98,8
	BRM 51205	99,9	95,9	100,0
<i>F. graminearum</i>	BRM 51203	98,4	93,6	95,2
	BRM 51206	92,7	90,1	88,1
Coeficiente de determinação (R^2)	0,92434	0,83112	0,90008	

As etapas de pré-processamento SNV das imagens e construção do modelo PLS-DA estão apresentadas na Figura 9. Neste método, uma imagem hiperespectral capturada e as propriedades espectrais de cada pixel na imagem são analisadas em vários comprimentos de onda.

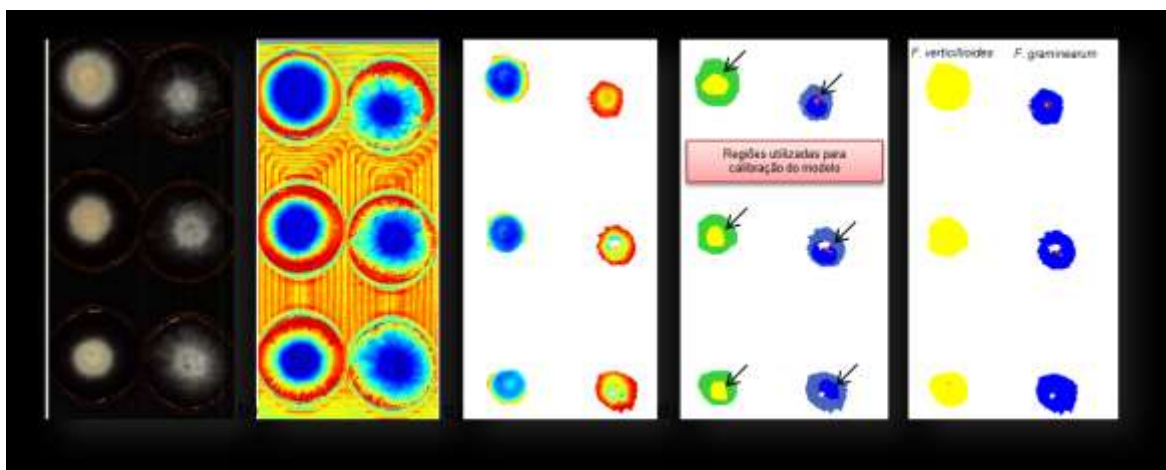


Figura 9 – Etapas do processo de modelo de classificação por PLS-DA: a) Imagem RGB dos fungos *F. verticillioides* e *F. graminearum* utilizados no modelo de classificação das espécies; b) Imagem do Contour 2D do modelo PCA antes da remoção do *background*; c) Imagem do *Contour* 2D do modelo PCA após remoção do *background* e com os pré-processamentos aplicados (dados centrados na média + SNV); d) e e) Imagem do modelo PLS-DA ilustrando os conjuntos de calibração e validação.

Para determinar a separação das espécies de isolados avaliadas utilizou-se o modelo PLS-DA em pixel. O modelo PLS-DA foi calculado com duas amostras de calibração (4VLs) e a validação externa com as 13 amostras que produziram resultados (%) semelhantes para as amostras avaliadas. Os pré-tratamentos primeira derivada e SNV+1ªDerivada não melhoraram o desempenho do modelo. O desempenho do modelo foi mensurado pela análise da matriz de confusão para a determinação das figuras de mérito: precisão da classificação, sensibilidade, especificidade e taxa de erro de classificação (Tabela 6), conforme Sokolova et al. (2006). Além disso, também foi calculado o coeficiente de determinação (R^2) para o modelo de calibração, que apresentou um alto valor de 0,92434 e RMSEP 0,03735 indicando a facilidade de identificação precisa das duas espécies de fungos.

Com a técnica HSI-NIR foi possível distinguir todas as espécies de isolados de *Fusarium* que foram avaliadas, corroborando com os resultados da técnica de identificação molecular.

O modelo PLS-DA com as espécies de *F. verticillioides* e *F. graminearum* apresentou excelente resultado de classificação, com precisão de 100%.

Tabela 6. Parâmetros de classificação para o modelo de PLS-DA em pixel para as amostras de isolados de *Fusarium* spp. do conjunto teste

Análise		R ²	Precisão da Classificação (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Taxa de erro de Classificação (%)
Modelo PLS-DA		0,92434	100,00	-	-	0,00
Isolado	Espécie					
BRM 32977	<i>F. verticillioides</i>	-	100,00	100,00	100,00	0,00
BRM 35317	<i>F. verticillioides</i>	-	100,00	100,00	100,00	0,00
BRM 35319	<i>F. verticillioides</i>	-	100,00	100,00	100,00	0,00
BRM 35329	<i>F. verticillioides</i>	-	100,00	100,00	100,00	0,00
BRM 35345	<i>F. verticillioides</i>	-	100,00	100,00	100,00	0,00
BRM 35388	<i>F. verticillioides</i>	-	100,00	100,00	100,00	0,00
BRM 35391	<i>F. verticillioides</i>	-	100,00	100,00	100,00	0,00
BRM 35412	<i>F. verticillioides</i>	-	100,00	100,00	100,00	0,00
CML 2743	<i>F. verticillioides</i>	-	100,00	100,00	100,00	0,00
BRM 51204	<i>F. verticillioides</i>	-	100,00	100,00	100,00	0,00
BRM 51205	<i>F. verticillioides</i>	-	100,00	100,00	100,00	0,00
BRM 51203	<i>F. graminearum</i>	-	100,00	100,00	100,00	0,00
BRM 51206	<i>F. graminearum</i>	-	100,00	100,00	100,00	0,00

A Figura 10 mostra a imagem de classificação em pixel do modelo, e demonstra o quão bem as espécies foram classificadas, com uma variância explicada de 92,41%. A VL1 capturou 52,7% da variância e mais 27,4% pela VL2. A VL3 foi responsável por 8,57% e a VL4 3,74% da separação das espécies. É possível observar a separação das duas espécies na Figura 10a.

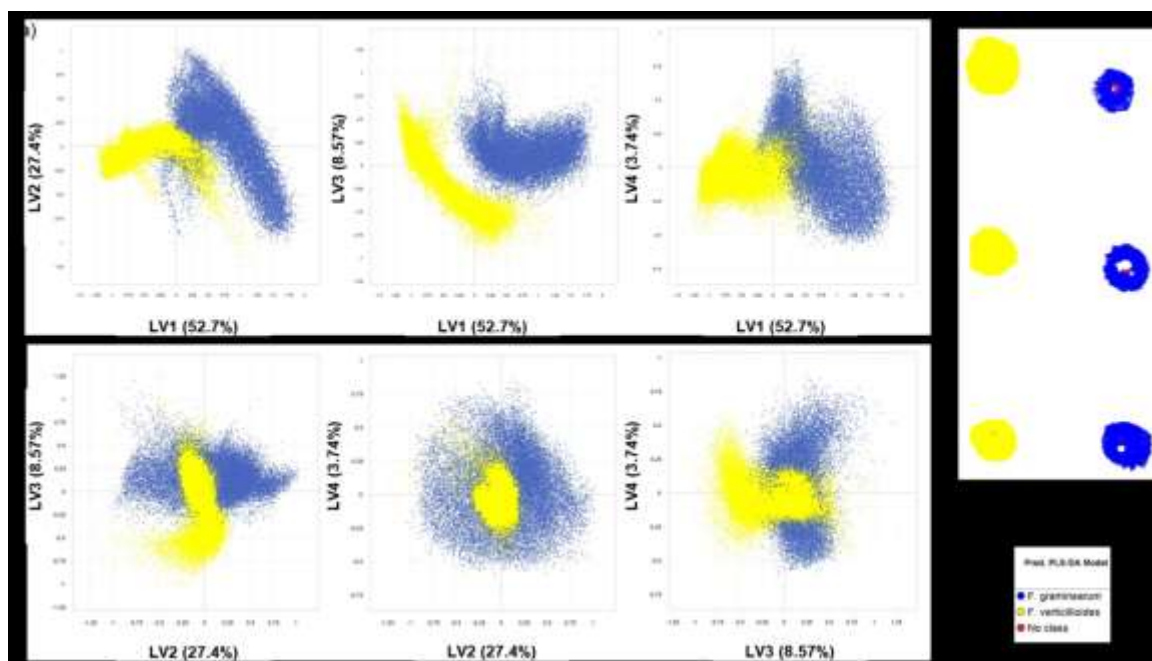


Figura 10 – Modelo de PLS-DA por pixel. a) Gráfico da variável latente 1 (52,7%) vs. variável latente 2 (27,4%), 1 vs. 3 (8,57%), 1 vs. 4 (3,74%), 2 vs. 3, 2 vs. 4, e 3 vs. 4. b) Imagem da classificação de *F. verticillioides* (CML 2778) em amarelo e *F. graminearum* (BRM 51202) em azul.

O modelo PLS-DA aplicado a *F. verticillioides* e *F. graminearum* permitiu uma classificação significativa entre as duas espécies, com 97,3% de pixels corretamente classificados e 100% de precisão, bem como uma alta sensibilidade e especificidade. Nossos resultados são reforçados por Williams et al. (2019), que usaram com sucesso a imagem hiperespectral HSI-NIR para diferenciar quatro patógenos associados ao grão de milho (*F. verticillioides* e *F. boothii*, *F. graminearum* e *Stenocarpella maydis*). No presente trabalho, a classificação geral de espécies por pixel do modelo atingiu uma precisão de 99,7%, demonstrando a eficácia do HSI-NIR para a diferenciação de espécies de fungos do gênero *Fusarium*.

CAPÍTULO II: DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS EM MILHO UTILIZANDO A TÉCNICA HSI-NIR ASSOCIADA A MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

4.2 Objetivos específicos

- Selecionar amostras de milho com contaminação por fumonisinas;
- Realizar a quantificação de fumonisinas B1 e B2 utilizando método padrão de análise HPLC;
- Desenvolver modelo multivariado utilizando a tecnologia HSI-NIR para quantificação de fumonisinas totais em grãos de milho.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta e seleção das amostras

As amostras foram coletadas de experimentos realizados pela Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas - MG) durante o ano de 2018. O total de 2040 grãos de milho de 6 cultivares diferentes foi utilizado para dividir as amostras em 51 conjuntos de amostras de 40 grãos cada. Os grãos de milho foram rastreados de acordo com o grau de contaminação por fumonisina após análise por CLAE. Assim, um total de 51 amostras foram utilizadas para obter a informação multiespectral e divididas em conjunto de calibração (42 amostras) e conjunto de validação (9 amostras) usando o algoritmo Kennard-Stone (KENNARD & STONE, 1969).

5.2 Análise das imagens por HSI-NIR

A obtenção das imagens HSI-NIR para a realização das análises de quantificação de fumonisinas em grãos de milho foram realizadas no Laboratório Avançado de Tecnologia Química (LATECQ) situado na Embrapa Algodão, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

5.2.1 Preparação das amostras

As amostras de milho foram acondicionadas em sacos de papel Kraft e encaminhadas para o LATECQ. Foram utilizados 40 g de cada amostra de milho para compor esse estudo.

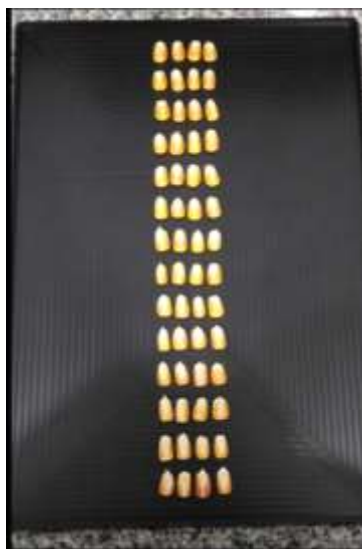


Figura 11 – Modelo de captura das imagens das amostras de milho utilizadas, contendo espaço entre os grãos e orientação do gérmen voltada para cima.

Para controle de temperatura e umidade, as amostras foram dispostas em uma sala do laboratório climatizada. As capturas das imagens dos grãos de milho (Figura 11) foram realizadas em Outubro/2019.

5.2.2 Sistema de Imagens Hiperespectrais NIR

As imagens HSI-NIR das amostras de de grãos de milho foram realizadas utilizando espectrômetro sisuChema SWIR-Specim® (Spectral Imaging Ltd, Oulu, Finland) com uma faixa espectral de 1000–2500 nm, amostragem espectral de 6,25 nm, resolução espacial de 10nm, tamanho da imagem de 150 × 150 μm, 256 faixas de comprimento de onda, uma câmera de alta performance, uma lente de 50mm de Campo de Visão (FOV) e software ChemaDAQ.

5.2.3 Aquisição das imagens

A aquisição das imagens pela técnica HSI-NIR inclui a digitalização da amostra formando uma matriz linear ao longo do eixo X e da imagem em movimento pelo eixo Y, formando um hipercubo 3D que contém informações de imagem espectral e espacial, as quais serão utilizadas posteriormente para quantificar o teor de fumonisinas em grãos de milho. Para a realização das análises as imagens foram salvas no formato “raw” para posterior tratamento.

5.2.4 Determinação de Fumonisinas (B1 e B2) utilizando a técnica CLAE

Os teores de Fumonisinas B1 e B2 foram determinados por HPLC de acordo com método oficial da AOAC (AOAC, 2001) para análise de fumonisinas B1 e B2, com modificações. As amostras de milho foram trituradas em moinho (marca IKA, modelo A11) e, em seguida, 10 g foram pesadas, acrescidas de 50 mL de solução de extração água:metanol:acetonitrila (50:25:25 v/v) e agitadas por 40 min em mesa agitadora (marca Nova Ética, modelo 109) a 200 rpm. Posteriormente, os extratos foram centrifugados à 3000 rpm por 10 min e filtrados em papel de filtro qualitativo para retirada de impurezas. Retirou-se 5 mL do filtrado, adicionou-se 20 mL de solução de PBS (tampão fosfato) e procedeu-se a filtragem com filtro de microfibras de vidro. Uma alíquota de 10 mL desse filtrado final foi disposta em seringa acoplada à coluna de imunoafinidade FumoniTest (Vicam®). Após eluição da amostra, por gravidade, realizou-se a lavagem da coluna com 10 mL de solução tampão PBS para retirada de impurezas. Em seguida, injetou-se 2,5 mL de metanol grau HPLC (uma gota por segundo) que eluiu pela coluna juntamente com as fumonisinas. As amostras foram coletadas em cubeta de vidro e levadas a um banho a 50-55 °C sob fluxo de ar comprimido seco até completa secagem e depois, foram ressuspendidas em solução acetronitrila:água (1:1 v/v). Uma alíquota de 50 µL dessa solução foi adicionada de 50 µL da solução derivatizante de O-ftaldialdeído com 2-mercaptoetanol (OPA). Posteriormente, foi realizada injeção da amostra em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Waters Alliance™ 2695, com coluna fase reversa C18, detector de fluorescência com 335 nm excitação e 440 nm emissão, tempo de retenção de aproximadamente 4 minutos para FB1 e 9 minutos FB2. Ao final foi realizada a quantificação dos teores de Fumonisinas B1 e B2 utilizando uma curva analítica construída com padrão mix de fumonisinas 50 µg.mL⁻¹ (B1 + B2), Sigma Aldrich, código 34143.

A cada bateria de 20 amostras foi analisada uma amostra referência da Trilogy Analytical Laboratory com teor de fumonisinas totais de 4,1 ± 0,5 µg.kg⁻¹.

5.2.5 Construção do modelo multivariado

Para a construção do modelo de calibração multivariado para a determinação do teor de fumonisinas, primeiramente a partir de cada imagem foi obtido o espectro médio (1000 – 2100 nm) e pré-processado através do SNV, primeira e segunda derivada com o filtro Savitzky-Golay por meio do software The Unscrambler® v.10.5 (CAMO Software Inc., Oslo, Norway). A análise quantitativa dos espectros foi realizada com abordagens quimiométricas, baseadas no algoritmo de mínimos quadrados parciais (PLS). A cada imagem foi obtido o seu espectro médio após a retirada do background. O espectro médio de cada amostra foi associado ao teor de fumonisinas total (FB1 + FB2). Modelos PLS foram desenvolvidos para quantificar o conteúdo de fumonisinas (FB1 + FB2) em grãos de milho conforme o pré-tratamento utilizado e seleção de variáveis do software The Unscrambler®. O número ótimo de variáveis latentes (VL) dos vários modelos foi determinado com a previsão definida pelo cálculo dos erros de previsão para um intervalo de variáveis latentes e seleção da regressão com o erro mínimo (HAALAND & THOMAS, 1988).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Quantificação de fumonisinas em milho pelo método HSI-NIR

O conjunto de dados contém informações sobre os espectros médios obtidos a partir das imagens HSI-NIR e o teor de fumonisinas totais (FB1 + FB2) determinado por CLAE. O teor de fumonisinas dos grãos de milho quantificado pela técnica de CLAE variou de 564,0 a 18.133,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, e o valor médio foi de 4.955,40 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Os resultados estatísticos dos dados, incluindo os valores mínimo, o máximo, a média e o desvio padrão estão resumidas na Tabela 7. A concentração de FB1 + FB2 quantificada nas 51 amostras estão apresentados no histograma e na linha de distribuição normal apresentados na Figura 12. Os valores médios caracterizados pela maior frequência são devidos aos baixos níveis de contaminação do milho amostrado durante a safra 2018.

Tabela 7 – Dados estatísticos dos resultados do teor de fumonisinas totais (FB1 + FB2) ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) quantificados pela técnica CLAE em amostras de milho, safra 2018.

Conjunto de Amostras	Calibração	Validação
Número de amostras	42	9
Mínimo	564	863
Máximo	18133	9892
Média	4955,40	4475,33
DP	4390,87	3763,73

^a DP: desvio padrão.

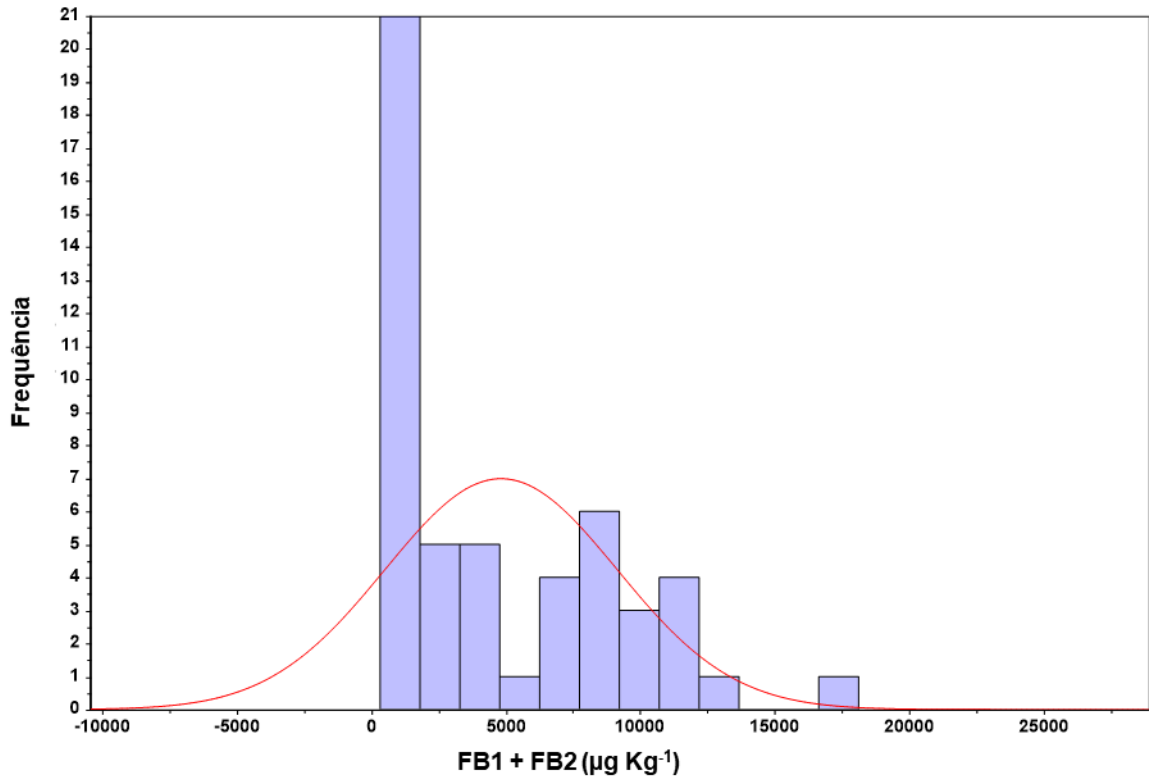


Figura 12 - Distribuição de frequência e curva normal das concentrações das fumonisinas FB1 + FB2.

A Figura 13 mostra os espectros de absorvância obtidos a partir dos espectros médios HSI-NIR das 51 amostras de grãos de milho totalizando 2040 grãos. As bandas de vibração dos grupos O-H, N-H e C-H no espectro NIR devido aos nutrientes são amplas e se sobrepõem. Na Figura 14, pequenas diferenças na faixa de 1500-2000 nm aparecem nos espectros após pré-tratamento MSC (para eliminar os efeitos de espalhamento da luz), em que mostra os espectros médios de amostras com conteúdo de fumonisinas acima e abaixo do limite ANVISA de 5.000,0 µg.kg⁻¹.

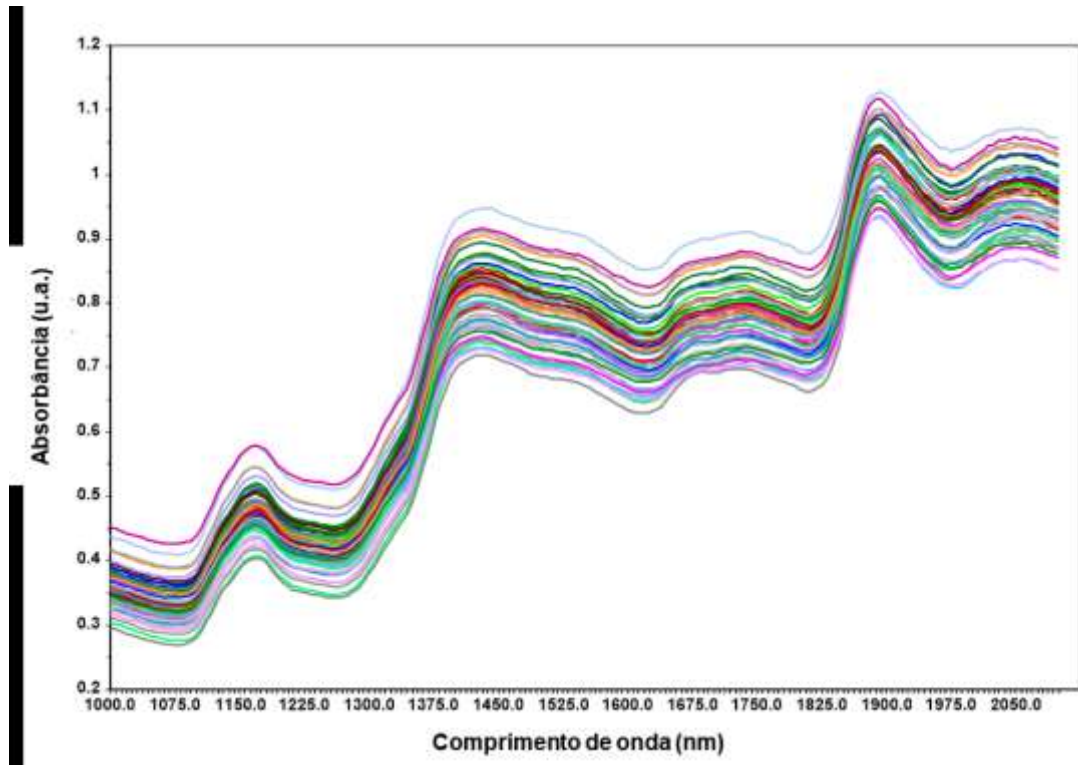


Figura 13 - Espectros de absorvância média bruta, obtidos de todos os grãos de milho da imagem do mosaico de 51 conjuntos de amostras.

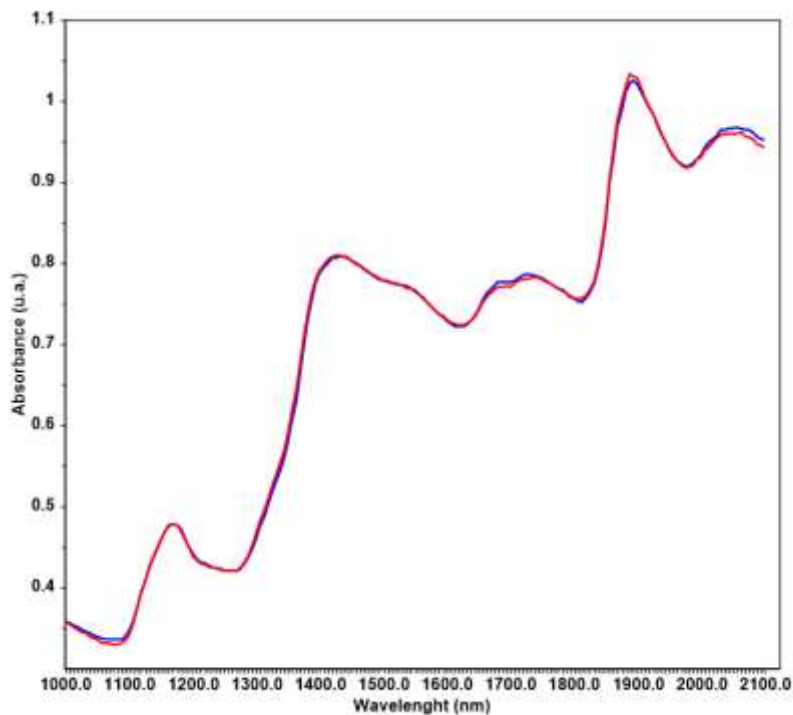


Figura 14 - Espectros de absorvância pré-tratados com MSC para amostra de milho contendo grãos com teor de fumonisinas (B1 + B2) acima (linha vermelha) e abaixo (linha azul) do limite da ANVISA ($5000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Uma análise de PCA foi realizada para reduzir a dimensionalidade e observar o comportamento das amostras estudadas. A partir dos resultados da PCA (Figura 15a), os seis componentes foram responsáveis por todas as variações espectrais, cerca de 98,45%. O gráfico de loadings para PC1 vs. PC2 (Figura 15b) mostrou bandas positivas proeminentes em 1331, 1625, 1812 e 1900 nm. As bandas negativas são 1162, 1387, 1418, 1825, 1893 e 1968 nm. Essas bandas podem ser atribuídas a grupos químicos relacionados a sinalizar uma diminuição nos níveis de reservas de alimentos armazenados no grão, conforme observado por Williams et al. (2012). Portanto, a principal causa da variação são as mudanças nas composições ou teores de amido e de proteína. Os escores da PCA apresentaram dois grupos, um à esquerda ($>5000 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de contaminação por fumonisinas) e um à direita ($<5000 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de contaminação por fumonisinas). O outro ponto observado é que as bandas negativas em PC1 vs. PC2 estão mais associadas a maior contaminação por fumonisinas (FENEMIAS, 2020).

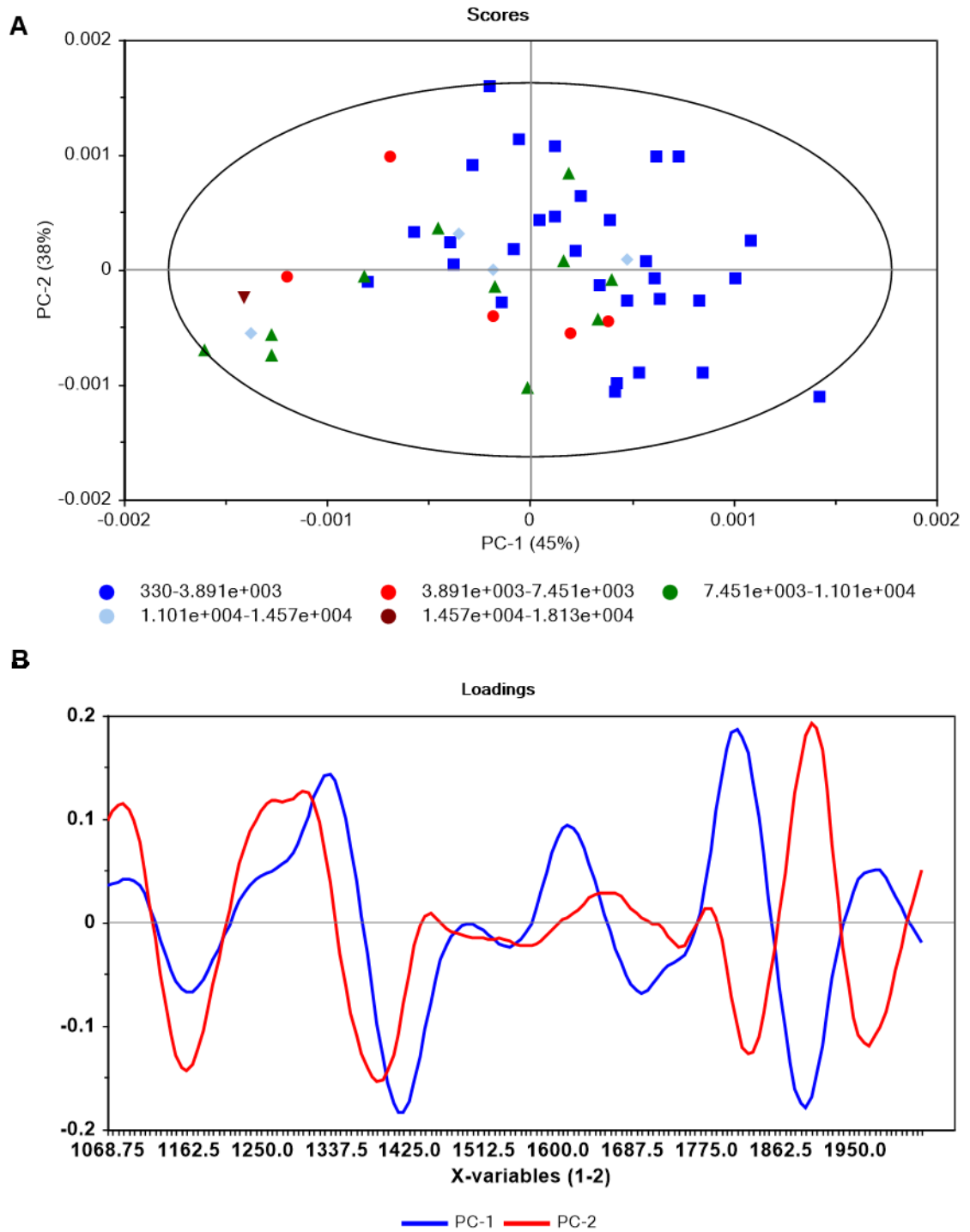


Figura 15 – Gráfico de PCA para PC1 vs. PC2 (A) e gráfico *loadings* para PC1 e PC2 (B).

No gráfico de *loadings* (Figura 15b) é possível observar bandas negativas intensas em 1162, 1387, 1418, 1825, 1893 e 1968 nm e bandas positivas em 1331, 1625, 1812 e 1900 nm. A região 1162 nm corresponde à absorção de carboidratos (estiramento do primeiro harmônico CH), as bandas negativas 1387 e 1418nm e a banda positiva 1331 nm correspondem ao segundo harmônico CH do carboidrato, e correspondeu ao alongamento simétrico de C = O e COO, deformações angulares dos grupos CH₂ e CH₃ dos ácidos graxos, indicando a presença de amido e sacarose (trecho OH, primeiro harmônico). As bandas em 1825 e 1895 nm referem-se à deformação angular do grupo O-H, e álcoois primários e secundários, respectivamente. A banda 1968 nm corresponde à absorção de amido, estiramento do terceiro harmônico N-H, estiramento do primeiro harmônico O-H, deformações no grupo O-H combinado com hidroxila. A região da banda positiva 1625 nm corresponde à absorção de proteínas, amidos secundários, estiramento do segundo harmônico de N-H. As regiões positivas 1812 e 1900 nm referem-se a deformação angular do grupo O-H e álcoois primários (OSBORNE & FEARN, 1986; BERARDO et al., 2005; PANERA, 2007; SANTOS et al., 2012).

Todos os espectros NIR coletados foram pré-processados com centralização na média, enquanto a presença de espalhamento e desvios de linha de base foram corrigidos pelo pré-tratamento SNV (variável normal padrão) e primeira ou segunda derivada Savitsky-Golay com janela de 11 pontos à direita e esquerda. As amostras foram divididas em conjuntos de calibração (n= 42) e validação (n= 9) utilizando o algoritmo Kennard-Stone (KENNARD & STONE, 1969). O conjunto de calibração cobre uma ampla faixa de concentração de fumonisina, conforme apresentado na Tabela 8.

Os resultados de todas as previsões quantitativas estão apresentados na Tabela 8. Os coeficientes de determinação (R^2_c e R^2_p) somente para o pré-processamento 2ª derivada no modelo de previsão quantitativa foi superior a 0,9. Todos os modelos apresentaram bias muito próximo de zero, indicando que não houve desvios sistemáticos dos valores reais.

Tabela 8 - Desempenho da determinação quantitativa de fumonisina obtida com o método PLS e métodos de pré-tratamento

Pré-processamento	VL	R ² _c	RMSEC (mg.kg ⁻¹)	R ² _p	Bias (mg.kg ⁻¹)	RMSEP (mg.kg ⁻¹)	RPD
SNV	10	0,97	621,72	0,65	-0,022	2106,22	2.1
1ª derivada	12	0,78	1994,29	0,71	0,010	1930,56	2.3
1ª derivada + SV	12	0,82	1805,46	0,78	0,044	1694,97	2.6
2ª derivada	12	0,96	822,45	0,94	0,008	890,35	4.9
2ª derivada + SV	12	0,92	1234,23	0,78	0,016	1674,34	2.6

VL: variáveis latentes, R²: coeficiente de determinação, RMSEC: raiz do erro quadrático médio da calibração, RMSEP: raiz do erro quadrático médio da previsão, RPD: desvio de desempenho da razão, SNV: variação normal padrão, SV: seleção de variáveis pelo Unscrambler.

Variáveis latentes (VLs) podem ser usadas para reduzir a dimensionalidade dos dados, e o número ótimo de variáveis latentes (VLs) foi determinado pelo menor valor da soma dos quadrados do erro residual previsto (PRESS) (HAALAND & THOMAS, 1988). Consequentemente, os modelos ótimos de calibração foram selecionados para alto R² e baixo RMSEC, RMSEP e bias (OSBORNE & DOUGLAS, 1981). O índice RPD relaciona o SEP com a variância e o intervalo nos dados de referência originais, levando em consideração que o RPD deve ser idealmente de pelo menos 2,4 (KENNARD & STONE, 1969).

Entre os modelos obtidos após diferentes pré-tratamentos dos espectros, o melhor resultado foi obtido para um conjunto de calibração contendo espectros médios de 42 amostras de milho com 12 variáveis latentes que apresentou os menores valores para RMSEC, RMSEP e maiores valores de R² e RPD. Assim, o pré-processamento por segunda derivada possibilitou a obtenção de um modelo com R² de 0,96 e RMSEC 822,45 µg.kg⁻¹ de fumonisinas (FB1 + FB2) em grãos de milho. A validação externa foi realizada com 9 amostras que obtiveram R² de 0,94 e RMSEP de 890,35 µg.kg⁻¹, (Figura 13). A legislação brasileira (ANVISA) prevê o teor máximo de 5000 µg.kg⁻¹ de fumonisinas (FB1 + FB2) em milho para posterior processamento (Figura 16).

Williams e Sobering (1996) indicaram que o valor de 3 ou mais para o índice RPD é recomendado para garantir um bom desempenho do modelo. Sendo

assim, o modelo obtido com o pré processamento 2ª derivada foi o que apresentou maior RPD (4,9). Entretanto, deve-se ressaltar que a precisão de um modelo depende de sua aplicação e dos erros de predição (RMSEP).

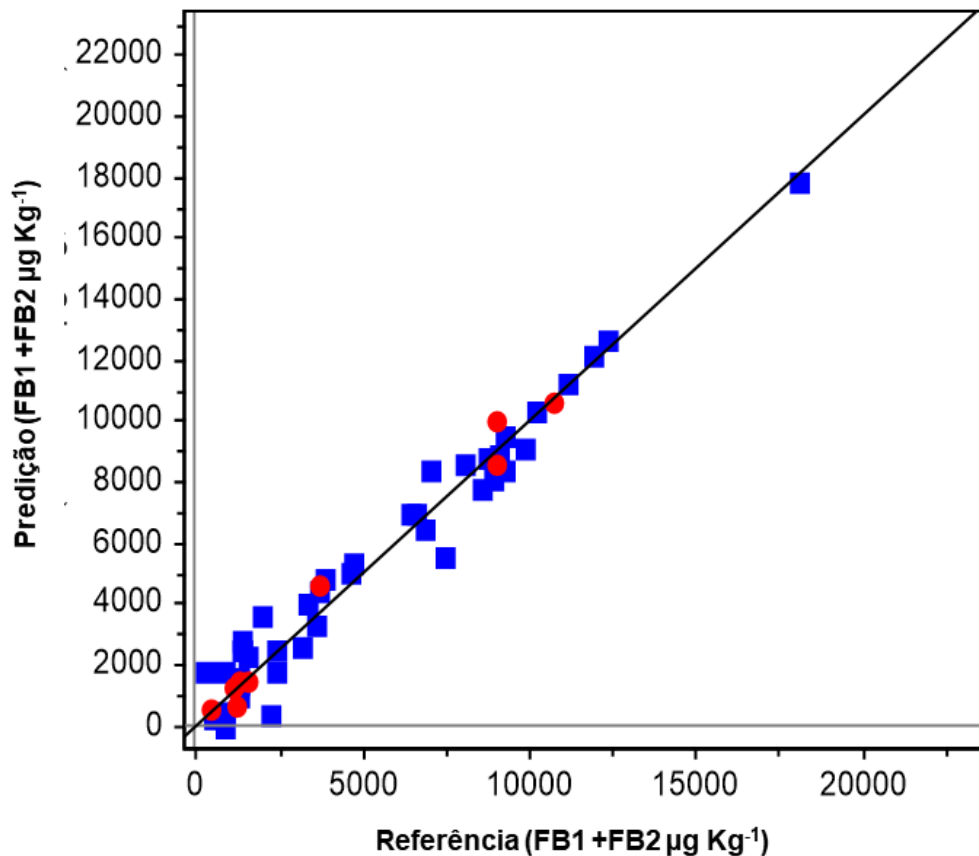


Figura 16 - Amostra predita vs. quantificada para a calibração PLS (azul) e validação externa (vermelho) definida em amostras de milho em grão.

Estudos preliminares usaram a tecnologia NIR para quantificação de fumonisinas, em que a maioria é baseada na espectroscopia de transformada de Fourier NIR (FT-NIR). Embora esta tecnologia não seja capaz de reconhecer a distribuição espacial dos cereais, Gaspardo et al., (2012) estimaram os teores de fumonisinas B1 + B2 em amostras de fubá de milho usando um espectrofotômetro FT-NIR, equipado com uma esfera de integração. A validação externa foi realizada com 25 amostras e apresentou os seguintes resultados para R^2 calibração, RMSEC, R^2 validação, RMSEP, bias com 15 VLs (0,964, 0,632 mg.kg⁻¹, 0,879, 0,917 mg.kg⁻¹ e -0,405, respectivamente. Giacomo et al., (2013) também desenvolveram uma triagem de milho moído contaminado com fumonisinas em

relação ao limite legal da Comunidade Européia usando FT-NIR. Para um conjunto de 128 amostras e 17 VLs, o resultado obtido foi um modelo PLS com uma correlação de calibração e validação igual a 0,995 e 0,908, e os valores de RMSEC ($0,232 \text{ mg.kg}^{-1}$) e RMSEP ($0,929 \text{ mg.kg}^{-1}$), respectivamente.

A imagem hiperespectral NIR está rapidamente se tornando uma importante tecnologia não destrutiva para a investigação da contaminação por micotoxinas em cereais (CAPORASO et al., 2018).

Firrao et al. (2010), usaram a tecnologia de imagem multiespectral (720-940 nm) para prever o teor de fumonisina em amostras de milho moído. Os resultados mostraram uma correlação significativa entre as previsões da análise de imagem e a concentração da micotoxina fumonisina determinada por CLAE. O modelo construído foi baseado em redes neurais e possibilitou a discriminação correta de 75 das 105 amostras em três classes (alta, média e baixa) de teores de fumonisinas.

Stasiewicz et al. (2017) avaliaram o uso potencial de um classificador multiespectral (470-1550 nm) na identificação e remoção de aflatoxina e fumonisina de uma grande quantidade de grãos de milho do Quênia. A redução dos teores de micotoxinas foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$), atingindo uma redução média de 83% em cada toxina após a utilização do classificador multiespectral.

Assim, os resultados obtidos com o presente estudo sugerem que a calibração multivariada dos espectros médios obtidos pela técnica HSI-NIR podem ser uma alternativa adequada para determinar o teor de fumonisinas em grãos de milho, identificando lotes contaminados e evitando a contaminação cruzada durante o processo de estocagem do milho.

Novas amostras deverão ser incorporadas ao modelo para permitir o desenvolvimento dessa tecnologia e aumentar a sua robustez na classificação ao conferir maior segurança na utilização do milho na nutrição humana e animal.

CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE UM EXTRATO FENÓLICO DE SORGO NO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.

4.2 Objetivos específicos

- Selecionar e recuperar fungos produtores de micotoxinas e causadores de doenças em plantas como milho e sorgo;
- Obter um extrato fenólico a partir de grãos de sorgo;
- Avaliar o efeito dos compostos fenólicos na curva de crescimento, na taxa de germinação de fungos fitopatogênicos e na análise de CIM;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Isolados fitopatogênicos

Os testes para avaliação do efeito antifúngico do extrato fenólico de sorgo foram realizados nos Laboratórios de Segurança Alimentar e de Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG e no Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, MG.

As cepas de fungos fitopatogênicos utilizadas neste trabalho se encontram preservadas na Coleção Micológica de Lavras e da Embrapa Milho e Sorgo. Os fungos selecionados das Coleções Micológicas foram os citados na literatura como os principais causadores de doenças em plantas como milho e sorgo, totalizando 32 isolados dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stenocarpella*, *Colletotrichum* e *Macrophomina* que foram recuperados em meio BDA. Dentre esses, 16 isolados obtiveram crescimento e foram armazenados (CASTELLANI, 1939) para futuras análises.

5.2 Obtenção do extrato fenólico de sorgo

Foram utilizados grãos do genótipo de sorgo SC 319, provenientes de um painel com 100 linhagens de sorgo, pertencente ao programa de Melhoramento Genético de Sorgo da Embrapa Milho e Sorgo. Esse genótipo foi selecionado por conter teores mais elevados de compostos fenólicos em testes preliminares realizados na Embrapa Milho e Sorgo (dados não publicados).

Os grãos foram decorticados em máquina beneficiadora de arroz e o farelo (pericarpo dos grãos) foi recolhido e levado para o Laboratório de Segurança Alimentar da Embrapa Milho e Sorgo onde foi moído em moinho de bolas (Marca: Retsch, modelo: MM200), obtendo-se uma farinha com granulometria de aproximadamente 10 μm .

O extrato fenólico foi obtido conforme Singleton et al. (1999), com modificações. Um grama de farelo de sorgo foi adicionado de 100 mL de solução de etanol/água (20/80%, v/v), e mantido em agitação de 200 rpm em mesa agitadora por 2 horas (Marca: Nova Ética, modelo: 109) e posterior centrifugação por 15 min a 2000g (RCF), o sobrenadante do extrato fenólico de sorgo foi

utilizado para análise do teor de compostos fenólicos. Optou-se por esse método de extração após terem sido realizados testes com diversos solventes, em diferentes concentrações e temperaturas, a fim de se obter um solvente eficaz, não tóxico e que apresentasse resultados similares aos encontrados com o uso de metanol (método convencional). Os resultados desses testes encontram-se na Tabela 9 (Resultados e Discussão).

O extrato obtido foi analisado quanto ao teor de compostos fenólicos totais pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (FC) (DYKES, 2008), utilizando ácido gálico como padrão de referência. Uma alíquota de 100 μL do extrato de sorgo foi retirada e acrescida de 1,1 mL de água deionizada, 0,4 mL de solução de reagente Folin-Ciocalteu e 0,9 mL de solução de Etanolamina. A leitura foi realizada a 600 nm em espectrofotômetro UV/VIS (Marca: Intrutherm, modelo: UV 2000A). Os extratos fenólicos foram liofilizados em Liofilizador (Marca: Terroni, modelo: LS3000) e ressuspensos em água deionizada (1 mg.mL^{-1}), segundo técnica descrita por Kil et al. (2009). A concentração do extrato fenólico de sorgo liofilizado foi de $266 \text{ mg GAE.g}^{-1}$) o qual foi utilizado no trabalho.

5.3 Avaliação do efeito antifúngico do extrato fenólico de sorgo (EFS)

5.3.1 Efeito antifúngico do EFS em meios sólido e líquido

Para este estudo foi utilizada a cepa fúngica de *Fusarium verticillioides* (CML 2743), que foi selecionada por se tratar de um dos gêneros que mais acomete e que causa maiores prejuízos à cultura do milho e sorgo. Meios de cultura BDA (batata-dextrose-ágar, meio sólido) e BD (batata-dextrose, meio líquido) foram incorporados ou não (controle) com o extrato fenólico de sorgo (EFS) liofilizado, na proporção de 1 mg.mL^{-1} ($266 \text{ mg GAE.g}^{-1}$), de acordo com trabalho realizado por Kil et al. (2009), que utilizou a proporção de 1 mg.mL^{-1} . O meio BD foi avaliado “com” (BDCA) e “sem” agitação (BDSA). Nos testes em meio sólido, discos de micélio ($\pm 5 \text{ mm}$ de diâmetro) retirados de bordas de colônias de *F. verticillioides* com 7 dias de cultivo foram transferidos para o centro da superfície do meio de cultura com os respectivos tratamentos descritos abaixo e ilustrados na Figura 17, conforme metodologia utilizada no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

T1. BDA (batata-dextrose-ágar): meio sólido + EFS

T2. BDCA (batata-dextrose): meio líquido com agitação + EFS

T3. BDSA (batata-dextrose): meio líquido sem agitação + EFS

Para o tratamento T1 (BDA) as placas foram mantidas em temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), durante 7 dias. A avaliação do crescimento micelial, mensurado pelo diâmetro da colônia, foi realizada a cada 24 horas, durante cinco dias.

Por meio de colônias puras de *Fusarium verticillioides* foi obtida a contagem do número de esporos produzidos durante 7 dias em meio líquido BD com agitação (T2 - BDCA). Nesse tratamento utilizou-se 40 mg de EFS em 40 mL de meio BD ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em Erlenmeyers de 50 mL. Efetuou-se a repicagem de um disco micelial ($\pm 5 \text{ mm}$ de diâmetro) de *F. verticillioides* para os Erlenmeyers (50 ml) contendo o meio líquido. Os Erlenmeyers foram mantidos sob agitação de 110 rpm, no escuro, durante 7 dias. Para a contagem de esporos, o extrato foi filtrado em gaze e diluído em água (1:1). A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico (Marca: Olympus, modelo: BX60).

No tratamento T3 (BDSA), utilizou-se um disco micelial de *F. verticillioides* ($\pm 5 \text{ mm}$ de diâmetro) colocado em Erlenmeyer com 40 mL de ágar batata dextrose, contendo 40 mg de extrato fenólico de sorgo. Após 7 dias de incubação em temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), o material foi filtrado em papel de filtro qualitativo (12,5 cm) e o micélio foi seco em estufa à 51°C até peso constante.

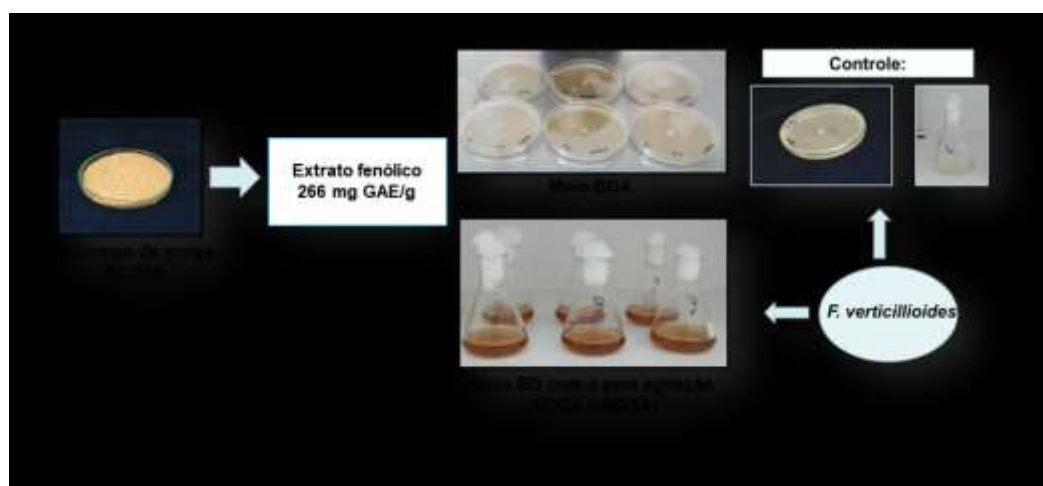


Figura 17 – Esquema de metodologia utilizada para avaliar o efeito do extrato fenólico no desenvolvimento de *Fusarium verticillioides*.

5.3.2 Concentração inibitória mínima (CIM) do EFS

Foram utilizados 16 isolados de fungos fitopatogênicos pertencentes à Coleção Micológica de Lavras e da Embrapa Milho e Sorgo, MG, e duas (2) linhagens referências (*C. albicans* e *C. neoformans*) pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), conforme Tabela 9. A espécie fúngica *C. albicans* foi selecionada como controle, pois na literatura há relatos de sua inibição sob o efeito de extrato fenólico de sorgo (KIL et al., 2009). E *C. neoformans* por se tratar de uma espécie largamente utilizada em experimentos com análise da CIM pelo Laboratório de Micologia da UFMG.

O estoque das culturas foi mantido em Castellani (CASTELLANI, 1939) e as linhagens foram repicadas previamente, a partir das amostras armazenadas, para placas de Petri contendo meio BDA.

Tabela 9 – Relação dos microrganismos utilizados para análise da CIM.

Nº	Identificação	Taxonomia
1	BRM 051202	<i>Fusarium graminearum</i>
2	CML 2743	<i>Fusarium verticillioides</i>
3	CML 2825	<i>Fusarium proliferatum</i>
4	CML 2793	<i>Fusarium andiyazi</i>
5	BRM 034978	<i>Aspergillus</i> sp.
6	BRM 035055	<i>Aspergillus</i> sp.
7	BRM 032174	<i>Aspergillus terreus</i>
8	BRM 038161	<i>Penicillium citrinum</i>
9	BRM 032157	<i>Penicillium pinophilum</i>
10	BRM 035045	<i>Penicillium</i> sp.
11	BRM 035317	<i>Fusarium verticillioides</i>
12	BRM 051204	<i>Fusarium verticillioides</i>
13	EMS01	<i>Stenocarpella maydes</i>
14	EMS02	<i>Stenocarpella maydes</i>
15	EMS03	<i>Colletotrichum</i> sp.
16	EMS04	<i>Macrophormina</i> sp.
17	SC5314	<i>Candida albicans</i>
18	H99	<i>Cryptococcus neoformans</i>

5.3.2.1 Preparo do inóculo

O inóculo fúngico foi preparado a partir das culturas fúngicas crescidas em placas de Petri, contendo meio BDA e incubadas por 7 dias a 28 °C. As colônias de fungos foram cobertas com 3 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl) acrescida de 1% de Tween 80 e submetidas a raspagem com auxílio de alça de repicagem para obtenção de uma suspensão e contagem de conídeos. Procedeu-se a contagem de conídeos em alíquota de 10 µL em câmara de Neubauer.

Para o ensaio de determinação da CIM por microdiluição em meio RPMI 1640, a concentração do inóculo corresponde à 2×10^4 e 2×10^3 UFC.mL⁻¹ para fungos testes e controle, respectivamente (SANTOS & HAMDAN, 2005).

5.3.2.2 Teste de susceptibilidade dos fungos ao extrato fenólico de sorgo

Para avaliação do efeito do extrato fenólico de sorgo (EFS) como antifúngico utilizou-se o método de microdiluição em caldo segundo o documento M60 proposto pelo CLSI (CLSI, 2017).

A solução de inibição do crescimento fúngico com EFS foi preparada na concentração de 40 mg.mL⁻¹ (10640 mg GAE.g⁻¹), máxima proporção realizada por quantidade de extrato, que posteriormente foi diluída até concentração desejada. Como controles foram utilizados os antifúngicos Itraconazol (ITRA), Fluconazol (FLU) e Anfotericina B (ANFB). Inicialmente, foram preparadas soluções-estoque de cada antifúngico na concentração de 2000 µg.mL⁻¹ solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) para ANFB e ITRA e em água destilada para FLU. Posteriormente, os antifúngicos e o EFS foram diluídos em meio RPMI 1640. Por meio de diluições seriadas, foram obtidas concentrações que variaram de 0,2 a 128 µg.mL⁻¹ para o itraconazol, 0,5 a 256 µg.mL⁻¹ para o fluconazol, 0,06 a 32 µg.mL⁻¹, e 10 a 5000 µg.mL⁻¹ para EFS contendo 2,66 a 1330 mg GAE.g⁻¹. Na sequência, alíquotas de 100 µL de cada diluição foram distribuídas nos orifícios da placa de microdiluição de 96 poços (Figura 18).

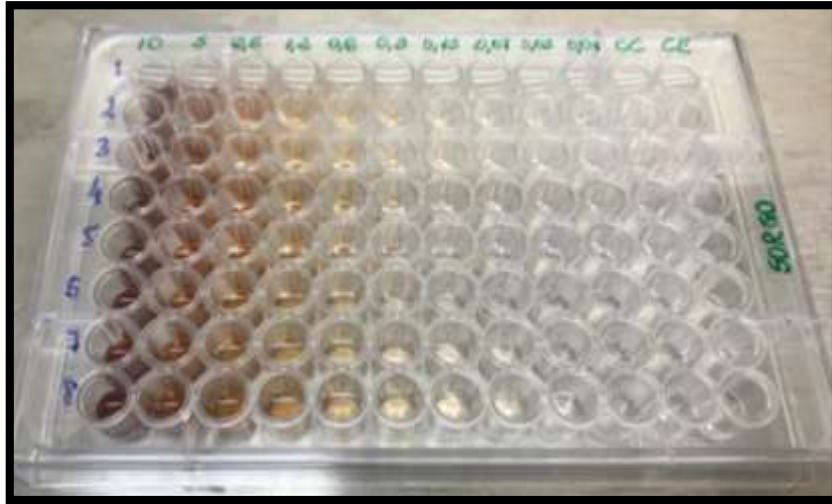


Figura 18 – Placa do teste de susceptibilidade (CIM) com a solução de EFS.

O teste de susceptibilidade foi realizado em placas de fundo chato, com 96 poços, esterilizadas. Um volume de 100 μL de cada diluição seriada foi dispensado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, foram adicionados 100 μL do inóculo fúngico, resultando em um volume final de 200 μL /poço.

Para o teste foram utilizados, em cada placa, um controle positivo, em que havia apenas o inóculo na ausência do antifúngico e do EFS e um controle negativo, onde foi dispensado apenas o meio RPMI 1640, sem inóculo, sem antifúngico e sem EFS. Posteriormente, as placas foram incubadas a 28 $^{\circ}\text{C}$ por 7 dias (CLSI, 2017).

O experimento foi realizado em duplicata e a leitura foi realizada pela observação visual da inibição de crescimento em cada poço, comparada com o crescimento observado no poço do controle positivo. Para o itraconazol e o fluconazol a CIM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir 80% do crescimento fúngico e para a anfotericina B e o EFS, foi considerada a menor concentração capaz de inibir 100% de crescimento (CLSI, 2017).

5.3.3 Taxa de germinação de conídeos

Para observar a germinação de conídeos fúngicos foram selecionados 14 dos isolados já analisados (n $^{\circ}$ 1 a 14 – Tabela 9). As amostras foram avaliadas com a adição de EFS na concentração de 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e sem a adição EFS. A

partir do inóculo dos diferentes fungos, previamente preparados e ajustados, 10^4 conídios/mL foram colocados em Caldo Batata Dextrose, homogeneizados em vórtex por 15 segundos e incubados a 28 °C por 24 horas. Após o período de 24 horas, alíquotas de cada amostra, na ausência e na presença do EFS ($5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram tomadas e o número de conídios germinados e não germinados foi determinado utilizando câmara de Neubauer. O percentual de conídios germinados foi calculado para cada isolado fúngico (LIU et al., 2007).

5.3.4 Curva de crescimento

Para este estudo foram selecionados 11 isolados que foram analisados nos testes de CIM e Germinação, identificados do nº 2 a 12 (Tabela 9).

A partir do inóculo dos diferentes fungos, previamente preparados e ajustados, 10^4 conídios/mL foram adicionados a meio RPMI 1640 e, posteriormente, incubados em tubos cônicos de propileno (50mL) a 28 °C na ausência e na presença de EFS ($5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O crescimento fúngico foi avaliado por meio do plaqueamento de alíquotas das diferentes condições experimentais nos tempos de 0, 8 e 24 horas após adição do inóculo fúngico em meio RPMI 1640. O experimento foi realizado em triplicata. Para cada tempo uma alíquota de 50 μL de cada amostra foi retirada e semeada em placa de Petri contendo BDA e após, foram incubadas a 28 °C para posterior avaliação. Após 48h de crescimento foi realizada a contagem das colônias obtidas em unidades formadoras de colônia (UFC.mL^{-1}).

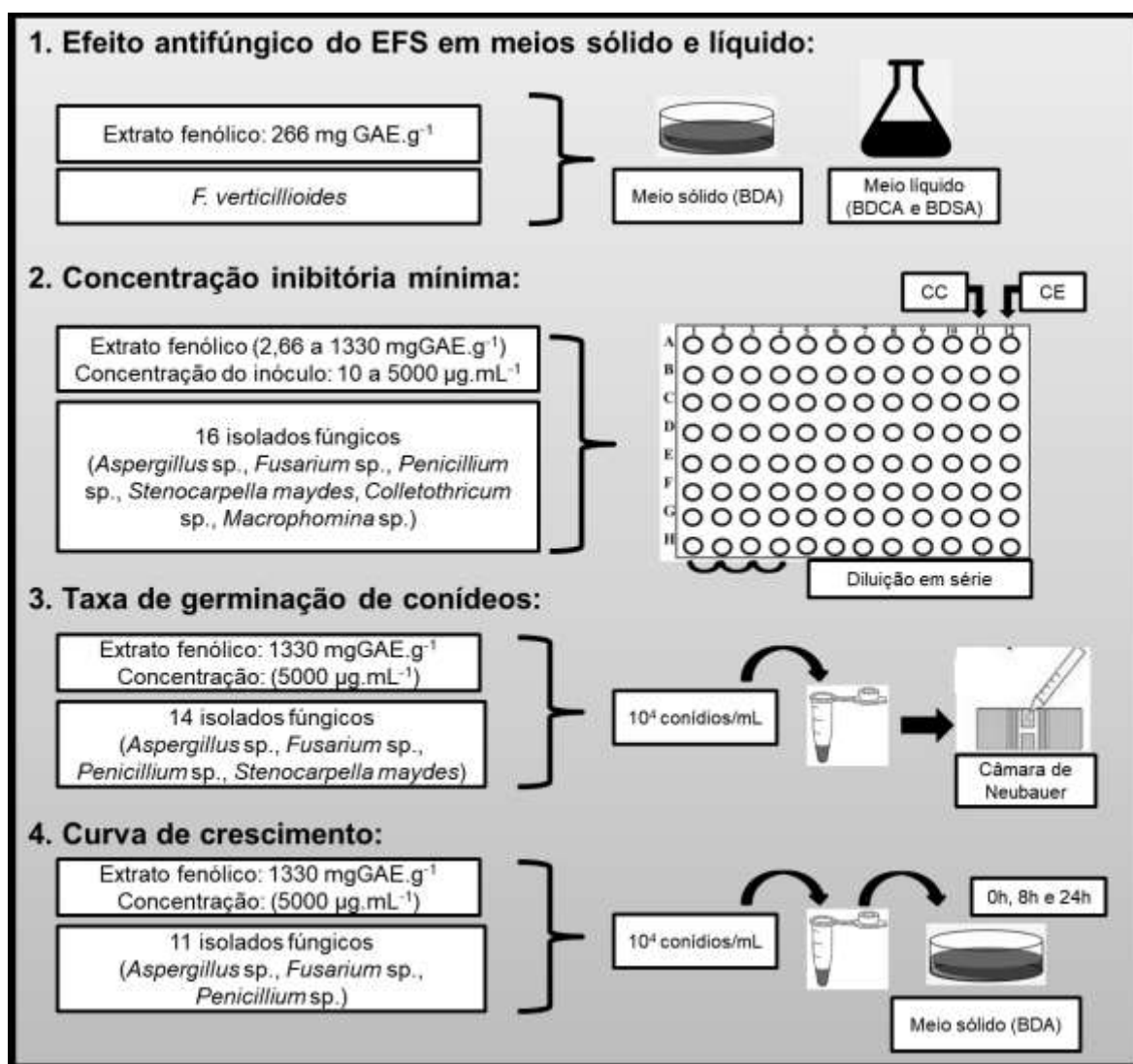


Figura 19 – Resumo das metodologias utilizadas.

5.3.5 Análise dos dados

Os dados referentes às avaliações de diferentes solventes para extração dos fenóis totais de sorgo, e de efeito antifúngico do EFS em meio sólido e líquido foram analisados por ANAVA com o auxílio do modelo computacional SISVAR (FERREIRA, 2003), e as médias foram submetidas ao teste de Tukey e Scott-knott a 5% de probabilidade.

Para análise dos dados de taxa de germinação e curva de crescimento foi utilizado o Software Prism 5 5.01 (GrapPad Inc., San Diego, CA, USA) utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey e, para as curvas de crescimento, foi determinada a área sob a curva. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Avaliação do extrato fenólico de sorgo como agente antifúngico no desenvolvimento de fungos fitopatogênicos

6.1.1 Teste de extração de compostos fenólicos de sorgo

Conforme se observa na Tabela 10, houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nos teores de compostos fenólicos de sorgo extraídos com diferentes solventes, os quais variaram entre 10,07 e 20,10 mg GAE.g⁻¹.

Observa-se que os solventes de 1 a 9 apresentaram resultados semelhantes e com melhor eficácia na extração dos compostos fenólicos. Sendo assim, o solvente Etanol 20% em temperatura ambiente foi selecionado e utilizado nos testes devido à sua capacidade de extração similar ao método convencional (metanol 1% HCl, em temperatura ambiente), porém, com menor toxicidade.

Tabela 10 - Extração de compostos fenólicos totais de sorgo utilizando diferentes solventes, em temperatura ambiente (TA) ou a 40 °C, com ou sem adição de 3% de ácido cítrico (AC)

Solvente	Teor de fenólicos totais (mg GAE.g ⁻¹)	
1 Metanol 1% HCl TA	18,77	A
2 Etanol 20% TA	17,49	A
3 Etanol 20% TA 3% AC	17,30	A
4 Etanol 20% 40°C	18,11	A
5 Etanol 20% 40°C 3% AC	16,97	A
6 Etanol 50% TA	19,02	A
7 Etanol 50% TA 3% AC	17,90	A
8 Etanol 50% 40°C	18,94	A
9 Etanol 50% 40°C 3% AC	20,10	A
10 H ₂ O 90°C 3% AC	12,50	C
11 Etanol 10% TA	14,93	B
12 Etanol 10% TA 3% AC	13,33	B
13 Etanol 10% 40°C	13,92	B
14 Etanol 10% 40°C 3% AC	14,78	B
15 H ₂ O TA	12,00	C
16 H ₂ O TA 3% AC	10,07	C
17 H ₂ O 40°C	13,71	B
18 H ₂ O 40°C 3% AC	10,62	C

Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-knott.

6.1.2 Avaliação do efeito antifúngico de compostos fenólicos de sorgo para *F. verticillioides*.

Verificou-se no tratamento BDA com aplicação do extrato fenólico de sorgo e no controle, os diâmetros das colônias de *F. verticillioides* foram, respectivamente, de 13,8 e 13,9 cm, (Tabela 11), ou seja, não houve efeito sobre o crescimento fúngico (Figura 20).

Tabela 11 - Efeito do extrato fenólico de sorgo (EFS) sobre o crescimento de colônias de *F. verticillioides* em meio sólido BDA.

Tratamento	Repetição	Diâmetro (cm)					Média
		1º	2º	3º	4º	5º	
BDA com EFS		7,5	9,3	11,1	13,2	13,8	13,9 a
	1	8,1	8,4	9,3	12,0	13,5	
	2	7,5	8,7	9,9	12,3	12,9	
	3	7,2	8,4	10,2	12,0	13,5	
	4	8,1	8,7	11,4	13,8	14,7	
	5	7,5	9,0	11,1	13,2	14,7	
BDA sem EFS (controle)		7,5	9,3	11,1	13,2	13,8	13,8 a
	6	8,1	8,7	9,9	12,0	14,1	

Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

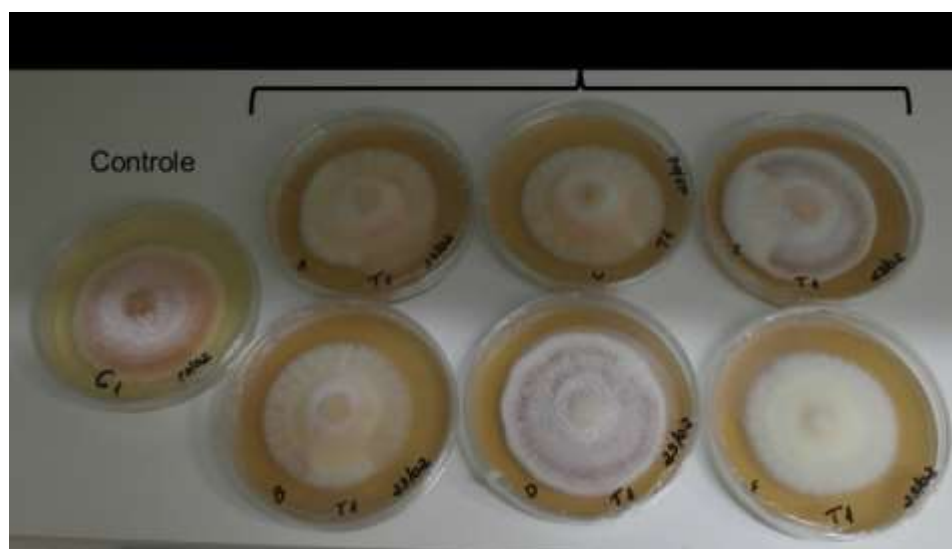


Figura 20- Crescimento de *Fusarium verticillioides* em tratamento contendo extrato fenólico de sorgo incorporado ao substrato BDA (meio sólido).

Da mesma forma que no meio sólido, nos meios líquidos sem (BDSA) e com agitação (BDCA) não houve efeito do EFS sobre o desenvolvimento de *F.*

verticillioides (Tabelas 12 e 13). Contrário ao esperado houve maior desenvolvimento do fungo no tratamento contendo o extrato fenólico de sorgo, tanto em BDSA (média de 2,147 g), quanto em BDCA (média de 257×10^5 esporos.mL) em relação ao grupo controle que teve médias de 0,373 g (BDSA) e 155×10^5 esporos.mL (BDCA).

Tabela 12 - Efeito do extrato fenólico de sorgo (EFS) sobre o peso seco de colônias de *F. verticillioides* em meio líquido sem agitação (BDSA).

Tratamento	Repetição	Peso (g)	Média
BDSA sem EFS (controle)		0,373	0,373 b
BDSA com EFS	1	4,871	2,147 a
	2	0,775	
	3	2,317	
	4	2,356	
	5	1,037	
	6	1,527	

Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 13- Efeito do extrato fenólico de sorgo (EFS) sobre o número de esporos de *F. verticillioides* em colônias obtidas no meio líquido mantido sobre agitação (BDCA).

Tratamento	Repetição	Nº de esporos ($\times 10^5$)	Média
BDCA sem EFS (controle)		155	155 b
BDCA com EFS	1	223	257 a
	2	245	
	3	222	
	4	251	
	5	290	
	6	311	

Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

De acordo com esses resultados preliminares, não houve redução da taxa de crescimento miceliano, bem como do número de esporos de *Fusarium verticillioides* (CML 2743) quando aplicado extratos fenólico de sorgo (EFS) no meio de crescimento. Portanto, não foi comprovado efeito desses compostos, obtidos do genótipo de sorgo SC 319, sobre o desenvolvimento desse patógeno.

6.1.3 Avaliação da susceptibilidade dos fungos fitopatogênicos ao extrato fenólico de sorgo

Conforme observado na Tabela 14, das amostras de fungos analisadas, todas apresentaram CIM acima de 5000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato fenólico de sorgo (EFS), entre 0,50 e acima de 32 para Anfotericina B, entre 0,25 e acima de 128 para Itraconazol, entre 8,0 e acima de 256 para Fluconazol. Portanto, após 7 dias de crescimento, foi possível notar que o extrato fenólico do sorgo SC 319 não apresentou efeito inibitório para o crescimento das espécies fúngicas analisadas, visto que todas as amostras obtiveram crescimento normal em detrimento daquelas que receberam os antifúngicos de controle.

Tabela 14- Concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato fenólico de sorgo (EFS) e dos antifúngicos itraconazol, anfotericina B e fluconazol, para diferentes espécies de fungos fitopatogênicos, determinada pelo método de microdiluição em caldo.

	Espécies fúngicas	EFS	Anfotericina B	Itraconazol	Fluconazol
1	<i>F. graminearum</i>	>5000	2,0	128	>256
2	<i>F. verticillioides</i>	>5000	16,0	128	>256
3	<i>F. proliferatum</i>	>5000	16,0	>128	>256
4	<i>F. andiyazi</i>	>5000	>32	>128	>256
5	<i>Aspergillus</i> sp.	>5000	2,0	>128	>256
6	<i>Aspergillus</i> sp.	>5000	32,0	0,50	>256
7	<i>A. terreus</i>	>5000	4,0	0,25	>256
8	<i>P.citrinum</i>	>5000	4,0	0,25	>256
9	<i>P. pinophilum</i>	>5000	4,0	128	>256
10	<i>Penicillium</i> sp.	>5000	1,0	0,50	>256
11	<i>F. verticillioides</i>	>5000	>32	128	>256
12	<i>F. verticillioides</i>	>5000	>32	>128	>256
13	<i>S. maydes</i>	>5000	>32	0,25	>256
14	<i>S. maydes</i>	>5000	>32	0,25	32,0
15	<i>Colletotrichum</i> sp.	>5000	0,50	0,25	8,0
16	<i>Macrophomina</i> sp.	>5000	16,0	0,25	256
	<i>C. albicans</i>	>5000	0,06	16,0	4,0
	<i>C. neoformans</i>	>5000	0,06	0,25	4,0

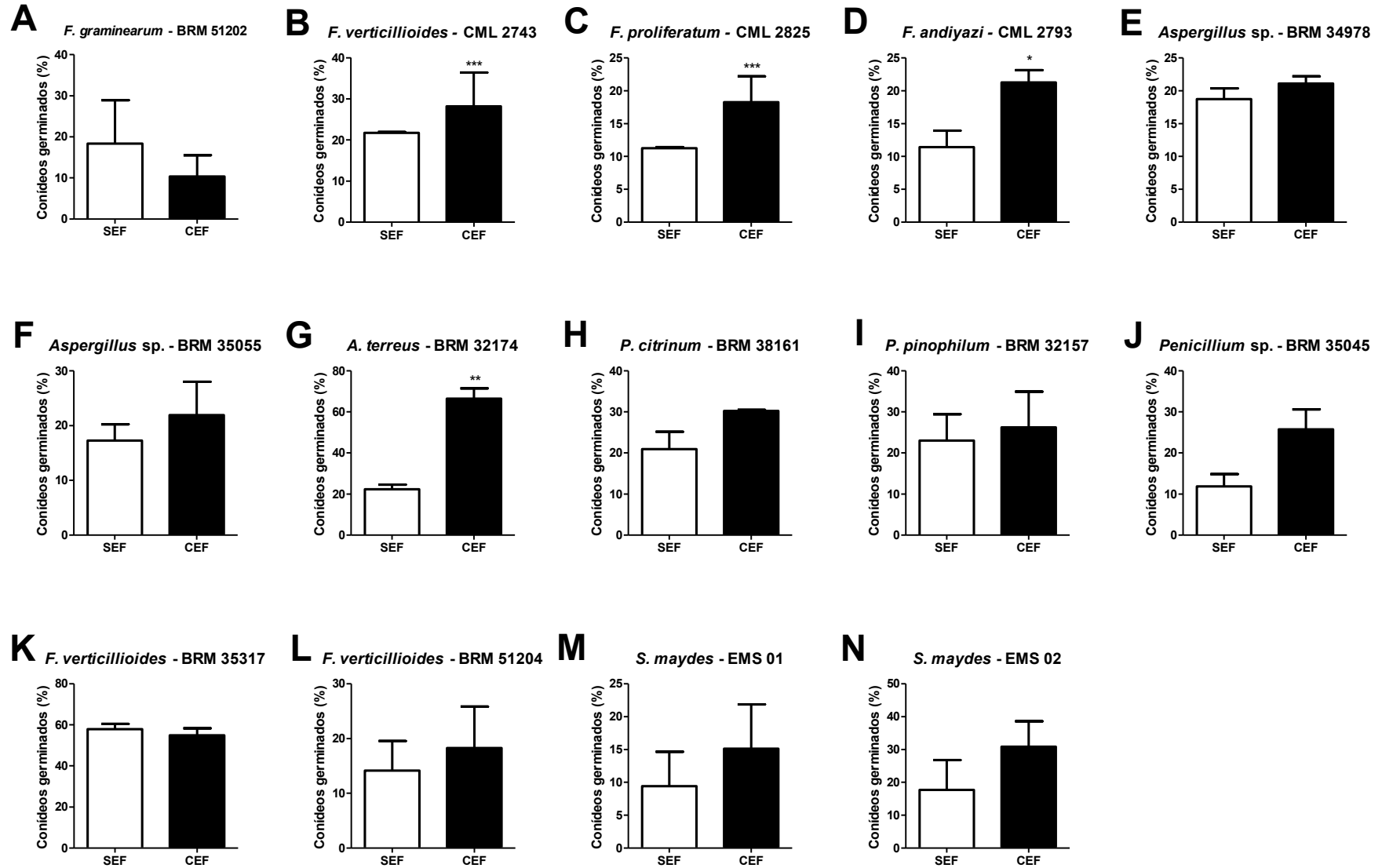
6.1.4 Efeito do extrato fenólico de sorgo no crescimento conidial de fungos

Na Figura 21 pode-se observar os conídeos germinados em amostras com EFS e a Figura 22 apresenta o percentual de conídios germinados para as espécies fúngicas após 24 horas em meio Caldo Batata Dextrose na ausência e na presença de EFS ($5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Observou-se efeito positivo do EFS sobre o percentual de conídios germinados, contrário ao esperado, ou seja, na presença do EFS as espécies representadas por B, C, D, e G apresentaram maiores percentuais de germinação quando comparadas com as amostras sem EFS. Esse resultado corrobora com aqueles observados nos testes preliminares para a espécie *F. verticillioides* - CML 2743(B), em que os valores no tratamento com EFS foram maiores que aqueles do controle. Para as demais espécies não houve diferença significativa na presença e na ausência do extrato. Dessa forma, os resultados demonstram que não houve efeito inibidor do EFS na germinação dos conídeos das espécies testadas.



Figura 21 – Germinação dos conídeos da amostra CML 2743 (*F. verticillioides*) em presença de EFS.

Figura 22 - Efeito do extrato fenólico de sorgo na germinação de conídios. Percentual de conídios germinados para as espécies fúngicas (A - N) após 24 horas em meio Caldo Batata Dextrose na ausência (SEF) e na presença (CEF) de EFS ($5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). * Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à ausência do EFS; ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

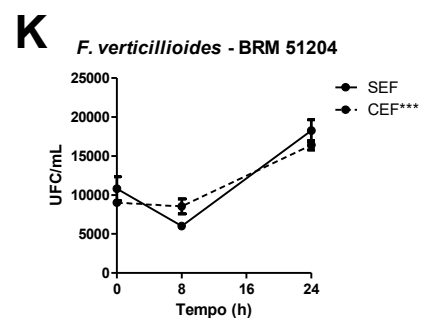
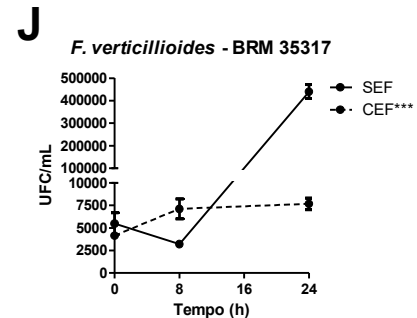
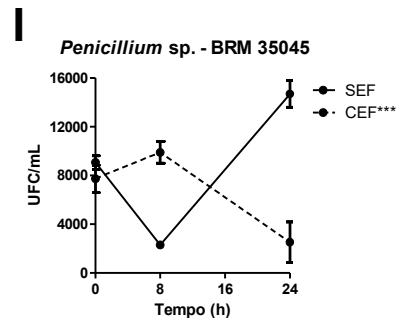
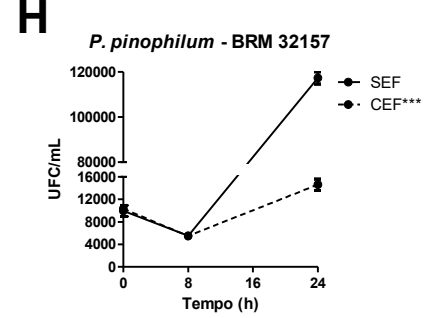
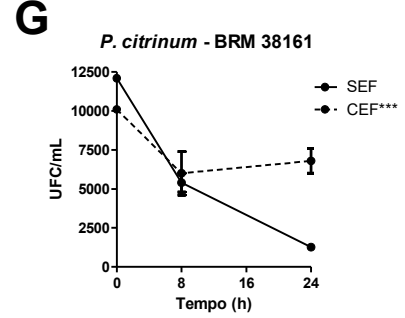
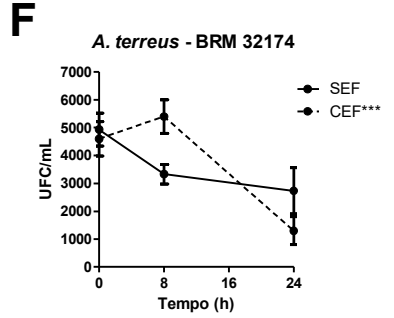
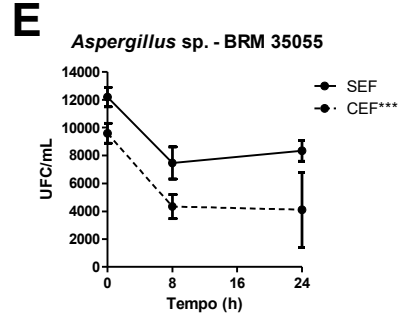
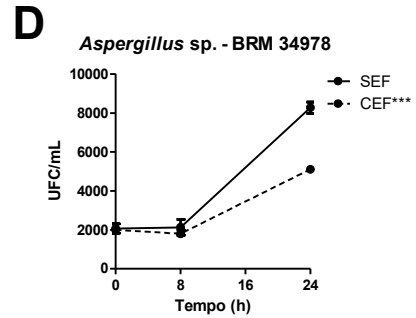
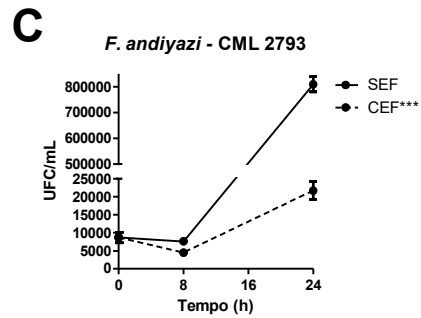
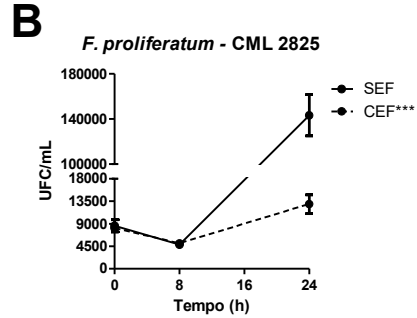
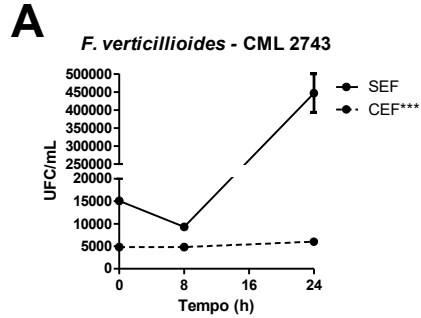


6.1.5 Efeito do extrato fenólico de sorgo no crescimento fúngico.

A avaliação do efeito do extrato fenólico de sorgo nas curvas de crescimento (0-24h) para as espécies fúngicas (UFC.mL⁻¹) são apresentadas na Figura 23.

Verificou-se diferença significativa no crescimento dos fungos na presença e na ausência de EFS. Na ausência do extrato, as amostras apresentaram maiores valores de UFC's.mL⁻¹. Após 48h de crescimento os dados mostraram que, quando aplicado o EFS, as amostras apresentaram menor contagem de UFC's do que as amostras controle. Esse resultado difere daqueles encontrados no teste preliminar e nos valores de CIM, que apresentaram crescimento total dos fungos em concentrações de EFS acima de 5000 µg kg⁻¹. Especula-se que esse resultado possa ser devido ao tempo de crescimento dos fungos, ou seja, na curva de crescimento a avaliação foi realizada após 48 h (2 dias) e no CIM após 168 h (7 dias), sugerindo que o EFS possa retardar o crescimento fúngico nas primeiras horas, visto que houve crescimento, porém, mais lentamente.

Figura 23 - Efeito do extrato fenólico de sorgo (EFS) no crescimento das espécies fúngicas. Total de Unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹) das espécies fúngicas (A - K) em 0, 8 e 24 horas na ausência e na presença de EFS (5000 µg.mL⁻¹). *Diferença significativa (p<0,05) em relação à ausência do EFS; ** (p<0,01); *** (p<0,001).



Esses resultados diferem dos encontrados por Ataei et al. (2007) que mostraram alta atividade antifúngica dos extratos fenólicos de sementes e folhas de *Sorghum bicolor* (0 – 25 mg.L) sobre *Fusarium poae* e *F. solani*. No presente trabalho, investigou-se o efeito do extrato fenólico de sorgo SC 319 sobre *F. verticillioides*, que pode ser uma espécie mais resistente que *F. poae* e *F. solani*.

Trabalho realizado por Javaid et al. (2012) investigou o potencial antifúngico de um capim alelopático, *Sorghum halepense*, para o manejo de *Macrophomina phaseolina* isolada de plantas de feijão-caupi infectadas com a podridão do carvão vegetal. O *Sorghum halepense* está classificado dentro do gênero *Sorghum* assim como as espécies *S. propinquum* e *Sorghum bicolor*. Os resultados encontrados mostraram que diferentes concentrações (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 g.100 mL de metanol) de extratos metanólicos de parte aérea, raiz e inflorescência, secas e moídas, de *S. halepense* foram eficazes quanto à sua atividade antifúngica in vitro contra *M.phaseolina*, reduzindo significativamente a biomassa fúngica.

Trabalho semelhante, realizado por Ratnavathi & Sashidhar (2007) avaliou o efeito dos extratos fenólicos de 6 cultivares de sorgo (IS 620, AON 486, LPJ, IS 17779, SPV 86 e SPV 462), que foram estimados pelo método Folin-Denis com teores de fenóis totais variando de $0,45 \pm 0,02$ a $9,39 \pm 0,31 \mu\text{g.g}^{-1}$, para avaliar o crescimento fúngico de *Aspergillus parasiticus* (inóculo $2,2 \times 10^5$) foram utilizadas as concentrações de fenólicos em 0,01; 0,1 e 1% em meio líquido, e foi possível observar redução na biomassa fúngica quando aplicado o extrato.

Kil et al. (2009) observaram que, de quatro cultivares de sorgo (Gumeunchalsusu, Bulkeunchalsusu, Jangsususu e Neulsusu), extraídas com metanol e, fracionadas com n-hexano, acetato de etila, n-butanol e água, os extratos fenólicos das amostras foram entre 4,0 e $129 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, por metodologia de DPPH, com diluições feitas nas faixas de concentração entre 7,8 e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para a análise de CIM, o extrato metanólico da cultivar Bulkeunchalsusu exibiu o maior nível de atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *K. pneumoniae* e *C. albicans*. Esse resultado difere dos resultados encontrados nesse experimento quando comparado o efeito do EFS para inibição da espécie *C. albicans*, pois nesse trabalho não houve inibição do crescimento da

amostra controle *C. albicans*. Especula-se, com base nesse o estudo de Kil et al.(2009) que pode haver efeito da cultivar sobre a inibição do crescimento fúngico.

Os resultados apresentados por Funnell-Harris et al. (2017) corroboram os obtidos neste trabalho. De acordo com os autores, quando cultivado *F. thapsinum* em meio com extrato de sorgo (*bmr6*), o crescimento fúngico foi significativamente mais rápido que o controle e, também, que os meios adicionados com açúcar. Resultado semelhante foi observado, no presente trabalhoem que o *F. verticillioides* apresentou maior crescimento que o controle, no teste preliminar e no teste de germinação de conídeos, em que algumas espécies apresentaram maiores taxas de germinação na presença que na ausência do EFS.

Funnell-Harris et al. (2014), avaliaram o efeito dos ácidos ferúlico, vanílico, sinápico, síngico e cafeico (compostos fenólicos) de sorgo, em concentrações entre 0 a 5,0 mM para ácido ferúlico, 0 a 7,5 mM para ácido vanílico e síngico, 0 a 6.0 mM para ácido sinápico e, 0 a 10,0 mM para ácido cafeico, sobre o crescimento *in vitro* de *F. thapsinum*, que mostrou ser tolerante para a esses compostos. Porém, quando colocados em teste no crescimento de outras espécies, os autores observaram inibição na taxa de crescimento fúngico de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *M. phaseolina* mesmo na concentração mais baixa de ácido ferúlico (0,5 mM). Dessa forma, os autores relatam que o ácido ferúlico pode inibir vários fungos, podendo ser empregado na resistência das plantas a patógenos fúngicos. No entanto, o patógeno de sorgo altamente virulento *F. thapsinum* foi relativamente tolerante a este e a quatro outros fenólicos utilizados no trabalho.

De acordo com Gordana et al. (2007) além da presença de compostos fenólicos a atividade antimicrobiana em extratos de plantas depende também da presença de vários metabólitos secundários. Awika & Rooney (2004) sugerem que a atividade antimicrobiana do sorgo pode ser devido à presença de taninos, e acreditam que outros fenóis podem contribuir, de forma sinérgica, com seu poder antimicrobiano.

Embora o genótipo SC 319, utilizado no presente trabalho, contenha altos teores de taninos (Anunciação et al., 2017), é possível que ele possua baixo teor de ácido ferúlico, cuja atividade antifúngica foi demonstrada no estudo de Funnell-

Harris et al. (2014). Assim, sugere-se a realização de outros trabalhos com genótipos de sorgo que contenham maior teor de ácidos fenólicos, especialmente o ferúlico, visando comprovar o efeito inibidor deste sobre diferentes espécies de fungos.

Embora alguns trabalhos na literatura apresentem resultado positivo para a inibição fúngica utilizando extrato fenólico de sorgo, não foi possível comparar as concentrações dos mesmos, devido às metodologias distintas utilizadas nas quantificações dos diferentes EFS. Neste trabalho não foi possível observar efeito inibitório do EFS e, contrário ao que se esperava, a presença do EFS estimulou o crescimento de algumas espécies fúngicas avaliadas. Dessa forma, sugere-se novos estudos para avaliar o potencial do EFS no estímulo ao crescimento de fungos importantes para produção de insumos alimentícios e/ou farmacêuticos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, o uso de técnica molecular por meio do sequenciamento de DNA da região fúngica ITS do espaçador transcrito 18S-28S mostrou-se útil para a identificação de isolados fúngicos e espécies do gênero *Fusarium*. Os resultados obtidos revelaram que a tecnologia de imagem hiperespectral no infravermelho próximo (HSI-NIR) é uma ferramenta útil para categorizar duas espécies agrícolas importantes de *Fusarium*. O método HSI-NIR e a regressão multivariada podem ser uma alternativa adequada para determinar o teor de fumonisinas em grãos de milho. A relação custo/ benefício mostrou que a técnica (HSI-NIR) apresenta maior vantagem sobre as técnicas padrão de identificação de fungos e quantificação de micotoxinas, por ser mais fácil e rápida de executar, além de menos onerosa, possui uma abordagem não destrutiva e de menor impacto ao ambiente. A aplicação de (HSI-NIR) para identificar espécies de *Fusarium* e quantificar fumonisinas pode fornecer uma ferramenta poderosa para monitorar a qualidade do milho conferindo maior segurança na utilização do milho na nutrição humana e animal. O extrato fenólico do genótipo de sorgo SC 319 não apresentou potencial antifúngico para as espécies fitopatogênicas utilizadas. Todavia, tendo em vista a importância desse tipo de estudo, sugere-se sua continuidade, com uso de extratos fenólicos de genótipos de sorgo que contenham diferentes perfis de compostos fenólicos, de modo a permitir uma melhor avaliação de seus efeitos antimicrobianos sobre diversos gêneros de fungos que acometem a cultura do milho.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Através dos resultados obtidos espera-se:

Cap. I: Ampliar os estudos com a técnica de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo e técnicas de análise multivariada de imagens para a identificação dos patógenos causadores de micotoxinas no grão de milho.

Cap. II: Ampliar os estudos com a tecnologia de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo e técnicas de análise multivariada de imagens e seleção de variáveis para desenvolver um método para identificar e/ou quantificar micotoxinas (Fumonisinhas e Zearalenonas) em grãos de milho.

Cap. III: Realizar estudos utilizando outros cultivares de sorgo, com outros métodos de quantificação dos extratos fenólicos, e testes que demonstrem o potencial estimulador desses compostos para o crescimento de certas espécies fúngicas, como leveduras e bactérias.

Publicações: O artigo do capítulo I já foi publicado na Revista Food Chemistry. Com os dados obtidos nos capítulos II e III serão redigidos 2 artigos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, P.S.R.; GAMBARRA-NETO, F.F.; COUTINHO, W.M.; ARAUJO, A.E.; SILVA, G.F.; GOUVEIA, J.P.G.; MEDEIROS, E.P. Near infrared hyperspectral images and pattern recognition techniques used to identify etiological agents of cotton anthracnose and ramulosis. *Journal Spectral Imaging*, v. 7, a.8, p. 1-17, 2018.

ALMEIDA, W.R.R.; SILVA, A.S.; PAULA, F.R.; SILVA, F.E.B.; FORESTI, G.R.; FERRÃO, M.F. Desenvolvimento de Modelos de Regressão Multivariada para a Quantificação de Benzoilmetronidazol na Presença de seus Produtos de Degradação por Espectroscopia no Infravermelho Próximo. *The Eletronic Journal of Chemistry*, v.7, n.4, p. 341-347, 2015.

ALMEIDA, G.A.V.; SILVA, L.M.; MARCHÃO, R.L. WADT, P.G.S.; SOUZA, A. M.; OLIVEIRA, L.C. Métodos Kjeldahl, elementar e o potencial da espectroscopia do infravermelho próximo para determinação de nitrogênio em solos da bacia do Acre. *Biota Amazônia Open Journal System*, v.6, n.4, p. 38-43, 2016.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v.25, n.17, p. 3389-3402, 1997.

ALVES, E. N. T. D.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; SILVA, O. A. Alternativas de controle para redução de grãos ardidos na cultura do milho. *Anais do XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo*, 29, Águas de Lindóia. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 587-592, 2012.

AMIGO, J.M.; MARTÍ, I.; GOWEN, A. Hyperspectral Imaging and Chemometrics: A Perfect Combination for the Analysis of Food Structure, Composition and Quality. In: *Data Handling in Science and Technology*, p. 343–370, 2013.

ANUNCIAÇÃO, P. C., CARDOSO, L. M., GOMES, J. V. P., DELLA LUCIA, C. M., CARVALHO, C. W. P., et al. Comparing sorghum and wheat whole grain breakfast cereals: Sensorial acceptance and bioactive compound content. *Food Chemistry*, 221, p. 984–989, 2017.

AOAC INTERNATIONAL, v.84, n.6, p. 117A–122A, 2001.

ARAÚJO, J. M. A. *Química de Alimentos: teoria e prática*. 5. ed. atual. ampl., Viçosa, MG. UFV, 2011.

ARBOS, K.A.; STEVANI, P.C.; CASTANHA, R.F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 60, n. 2, p. 161-165, 2013.

ATAEI AZIMI, A., DELNAVAZ, H.B., MANSOORGHANAIEI, A. Antifungal effects of water, alcoholic and phenolic extracts of seeds and leaves of *Sorghum bicolor* [L.] Moench on *Fusarium solani* and *F. poae*. *J. Med. Plants*. v.6, p. 26-32, 2007.

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W. Sorghum phytochemical and their potential impact on human health. *Phytochemistry*, v. 65, p. 1199–1221, 2004.

BARROSO, V. M. *Microbiota e ocorrência de fumonisinas em diferentes genótipos de milho transgênico (Bt)*. 2013. 88p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.

BELTRÃO, F. *Biocontrole de Fusarium verticilloides em milho*. 2011. 55p. Monografia (Graduação em Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná –UTFPR, Paraná, PR.

BENTO, L. F.; CANEPPELE, M. A. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; KOBAYASTI, L.; CANEPPELE, C.; ANDRADE, P. J. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 71 n.1, p. 44-49, 2012.

BERARDO, N.; PISACANE, V.; BATTILANI, P.; SCANDOLARA, A.; PIETRI, A.; MAROCCO, A. Rapid Detection of Kernel Rots and Mycotoxins in Maize by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.8128-8134, 2005.

BRERETON, R.G.; LLOYD, G.R. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *Journal of Chemometrics*, v. 28, p. 213–225, 2014.

BETTIOL, W.; MAFFIA, L. A.; CASTRO, M. L. M.P. *Control biológico de enfermedades de plantas en Brasil*. In: BETTIOL, W.; RIVERA, M. C.; MONDINO, P.; MONTEALEGRE, J. R.; COLMENÁREZ, Y. (Ed.). *Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe*. Montevideo: Facultad de Agronomía, Universidad de la República, p. 91-138, 2014.

BEZUIDENHOUT, C. *Near Infrared Hyperspectral Imaging: a rapid method for the differentiation of maize ear rot pathogens on growth media*. 2018, 138p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Stellenbosch, África do Sul.

BOEIRA, S. P. *Caracterização de efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda à micotoxina zearalenona em camundongos*. 2012. 101p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Pampa, Itaqui – RS.

BOLDRINI, B.; KESSLER, W.; REBNERA, K.; KESSLER, R.W. Hyperspectral imaging: A review of best practice, performance and pitfalls for in-line and on-line applications. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v. 20, p. 483–508, 2012.

BORDINI, J. G.; ROSSI, C. N.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Impacto das fumonisin, aflatoxinas e ocratoxina A na avicultura. *Biochemistry and Biotechnology Reports*, v.2, n.1, p. 68-88, 2013.

BORRÁS-LINARES, I.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; PALMEROS-SUÁREZ, P.A.; DEL VAL-DÍAZ, R.; ANDRADE-GONZÁLES, I.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; GÓMEZ-LEYVA, J.F.; SEGURA-CARRETERO, A. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and

antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, v. 69, p. 385-394, 2015.

BURGER, J.; GELADI, P. Hyperspectral NIR image regression part I: calibration and correction. *Journal Chemom*, v.19, n. 5–7, p. 355–36, 2005.

BURGER, J.E. *Hyperspectral NIR Image Analysis*. 2006. Tese (Doutorado) - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suécia.

CABRAL, C.; CAVALEIRO, C.; GONÇALVES, M.J.; CRUZ, M.T.; LOPES, M.C.; SALGUEIRO, L. *Otanthus maritimus* (L.) Hoffmanns. & Link as a source of a bioactive and fragrant oil. *Industrial Crops and Products*, v.43, p. 484-489, 2013.

CANCELLIER, L. L.; AFFÉRI, F. S.; ADORIAN, G. C.; RODRIGUES, H. V. M.; MELO, A. V.; PIRES, L. P. M.; CANCELLIER, E. L. Adubação orgânica na linha de semeadura no desenvolvimento e produtividade do milho. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.32, n.2, p. 527-540, 2011.

CAPORASO, N., WHITWORTH, M.B., FISK, I.D. Near-Infrared spectroscopy and hyperspectral imaging for non-destructive quality assessment of cereal grains. *Appl Spectrosc Rev.* v.53, n.8, p. 667–87, 2018.

CARVALHO, M.R.V. *Compatibilidade sexual de populações de Fusarium sacchari e espécies de Fusarium envolvidas na podridão do topo em cana-de-açúcar*. 2017. 70p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J Trop Med Hyg.* v.24, p. 270-276, 1939.

CASTRO, F. L. F. *Interação entre fungos toxigênicos (Aspergillus flavus e Fusarium verticillioides) e carunchos (Sitophilus zeamais) em amostras de grãos de milho*. 2011. 111p. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade de São Paulo, USP, São Paulo – SP.

CHOU, C.C.; CHEN, C.H.; LEE, T.T.; PECK, K. Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. *Nucleic Acids Research*, v.32, n.12, 2004.

CHOU, C.C.; LEE, T.T.; CHEN, C.H.; HSIAO, H.Y.; LIN, Y.L.; HO, M.S.; YANG, P.C.; PECK, K. Design of microarray probes for virus identification and detection of emerging viruses at the genus level. *BMC Bioinformatics*, v.7, 232, p. 1-12, 2006.

CHU, X., WANG, W., YOON, S. C., NI, X., HEITSCHMIDT, G. W. Detection of aflatoxin B1 (AFB1) in individual maize kernels using short wave infrared (SWIR) hyperspectral imaging. *Biosystems Engineering*, 157, p. 13-23, 2017.

CHU, X.; WANG, W.; NI, X.; ZHENG, H.; ZHAO, X.; ZHANG, R.; LI, Y. Growth Identification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by Visible/Near-Infrared Hyperspectral Imaging. *Applied Sciences*, v. 8, n. 4, p. 1-20, 2018.

CHUNG, K.T.; WONG, T.Y.; WEI, C.I.; HUANG, Y.W.; LIN, Y. Tannins and human health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 38, p.421–464, 1998.

CLSI. *Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. 1st ed. CLSI supplement M60. Wayne, P.A.: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Conab). *5º Levantamento de grãos - safra agrícola 2020/2021*. Brasília, 2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos> > Acesso em 01/02/2021.

CONCEIÇÃO, R. R. P. *Qualidade sanitária do milho armazenado em propriedades familiares situadas na região central de Minas Gerais*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2015.

COSTA, R. V.; QUEIROZ, V. A. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; LANZA, F. E.; ZAMBOLIM, L.; FIGUEIREDO, J. E. F. Prevalência de espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisinas associadas a grãos de milho no Brasil. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. Embrapa Milho e Sorgo, 2014.

CRUZ, J. V. S. *Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na Região de Pirassununga, Estado de São Paulo*. 2010. 88p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP.

CRUZ, C. S. A. *Emprego de óleos vegetais e glicerina no controle do gorgulho do milho*. 2013. 88p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande – PB.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, n. 3, p. 617-622, 2005.

DEL FIORE, A.; REVERBERI, M.; RICELLI, A.; PINZARI, F.; SERRANTI, S.; FABRI, A.A.; BONIFAZI, G.; FANELLI, C. Early detection of toxigenic fungi on maize by hyperspectral imaging analysis. *International Journal of Food Microbiology*, v.144, p. 64–71, 2010.

DE MORAES, R. F. *Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória* (No. 2506). Texto para Discussão, 2019.

DILL, K.; GHINDILIS, A. Electrochemical Detection on Microarrays.in: Dill, K.; Ghindilis, A. *Microarrays - Preparation, Microfluidics, Detection Methods, and Biological Applications*. New York: Springer, p. 25-34, 2009.

DORREPAAL, R.; MALEGORI, C.; GOWEN, A. Tutorial: Time series hyperspectral image analysis. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v. 24, p. 89–107, 2016.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, n.1, p. 11-15, 1987.

DYKES, L. *Flavonoid composition and antioxidant activity of pigmented sorghums of varying genotypes*. 2008. Dissertação - Texas A&M University, College Station, Texas, EUA.

ELMASRY, G.M.; NAKAUCHI, S. Image analysis operations applied to hyperspectral images for non-invasive sensing of food quality - A comprehensive review. *Biosystems Engineering*, v. 142, p. 53–82, 2016.

FAO. *The world agricultural production*. Disponível em:<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 07 de fevereiro de 2019.

FEMENIAS, A., GATIUS, F., RAMOS, A. J., SANCHIS, V., MARÍN, S. Use of hyperspectral imaging as a tool for Fusarium and deoxynivalenol risk management in cereals: A review. *Food Control*, 108, 106819, 2020.

FEMENIAS, A., GATIUS, F., RAMOS, A. J., SANCHIS, V., MARÍN, S. Near-infrared hyperspectral imaging for deoxynivalenol and ergosterol estimation in wheat samples. *Food Chemistry*, 341, 128206, 2021.

FERREIRA, D. F. *Programa SISVAR: sistema de análise de variância: versão 4.6 (Build 6.0)*. Lavras: UFLA, 2003.

FIESP. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. Safrá Mundial de Milho 2020/2021 – 10º Levantamento do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Informativo do Departamento de Agronegócio. 2021.

FIGUEIRA, E. L. Z.; COELHO, A. R.; ONO, E. Y. S.; HIROOKA, E. Y. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.24, n.2, p.359-378, 2003.

FRIAS, A. G. *Caracterização de isolados de Fusarium oxysporum f.sp. lactucaebotidos de campos de produção comercial no estado de São Paulo e avaliação de genótipos de alface*. 2014. 56p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu – SP.

FUNNELL-HARRIS, D. L., SATTLER, S. E., & PEDERSEN, J. F. Response of *Fusarium thapsinum* to sorghum *brown midrib* lines and to phenolic metabolites. *Plant Disease*, v. 98, p. 1300–1308, 2014.

FUNNELL-HARRIS, D. L., O'NEILL, P. M., SATTLER, S. E., GRIES, T., BERHOW, M. A., PEDERSEN, J. F. Response of sorghum stalk pathogens to brown midrib plants and soluble phenolic extracts from near isogenic lines. *European Journal of Plant Pathology*, v. 148, n.4, p. 941-953, 2017.

GASPERINI, A. M. *Biocontrole de Fusarium verticillioides em milho*. 2011. 55p. Monografia (Graduação em Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Francisco Beltrão – PR.

GIACOMO, D. Z. S. A multivariate regression model for detection of fumonisins content in maize from near infrared spectra. *Food Chem*, v. 141, p. 4289-4294, 2013.

GOETZ, A.F.H.; VANE, G.; SOLOMON, J.E.; ROCK, B.N. Imaging Spectrometry for Earth Remote Sensing. *Science*, v. 228, p. 1147–1153, 1985.

GOMES, K. R.; AMORIM, A. V.; FERREIRA, F. J.; FILHO, F. L. A.; LACERDA, C. F.; GOMES-FILHO, E. Respostas de crescimento e fisiologia do milho submetido a estresse salino com diferentes espaçamentos de cultivo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v.15, n.4, p. 365–370, 2011.

GONTIJO NETO, M. M.; SIMEONE, M. L. F.; GUIMARÃES, C. C.; ANDRADE, H. M.; QUEIROZ, L. R. SIMÃO, E. P. *Predição do teor de carbono total em solos de*

áreas experimentais de integração de lavouras-pecuária por meio da espectroscopia NIR. Minas Gerais. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012.

GORDANA, S. C., JASNA, M. C., SONJA, M. D., TUMBAS, V. T., MARKOV, S. L., DRAGOLJUB, D.C. Antioxidant potential, lipid peroxidation inhibition and antimicrobial activities of *Satureja montana* L. *Subsp. kitaibelii* extracts. *International Journal of Molecular Sciences*, 8, p. 1013–1027, 2007.

GOVINDACHARI, T.R.; SURESH, G.; GOPALAKRISNAN, G.; MASLAMANI, S.; BANUMATHI, B. Antifungal activity of some tetranortriterpenoids. *Fitoterapia*, v.71, n.3, p.317-320, 2000.

GOWEN, A.A.; O'DONNELL, C.P.; CULLEN, P.J.; DOWNEY, G.; FRIAS, J.M. Hyperspectral imaging - an emerging process analytical tool for food quality and safety control. *Trends in Food Science and Technology*, v.18, p.590–598, 2007.

GOWEN, A.A.; FENG, Y.; GASTON, E.; VALDRAMIDIS, V. Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. *Talanta*, v.137, p.43–54, 2015.

HAALAND, D.M., THOMAS, E.V. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information, *Anal. Chem.* 60, p. 1193-1202, 1988.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; MARINHO-PRADO, J. S.; NECHET, K. L.; MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. *Defensivos Agrícolas Naturais: Uso e Perspectivas*. 1ª ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Embrapa Meio Ambiente, Brasília, DF, 853p., 2016.

HAMINIUK, W. I. C.; MACIEL, G.M.; PLATA-OVIEDO, M.S.V.; PERALTA, R.M. Phenolic compounds in fruits – an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 27, p. 2023-2044, 2012.

HARRIS, L.J.; BALCERZAK, M.; JOHNSTON, A.; SCNEIDERMAN, D.; OUELLET, T. Host-preferential *Fusarium graminearum* gene expression during infection of wheat, barley, and maize. *Fungal Biology*, v.120, p.111-123, 2016.

HERMANNNS, G.; PINTO, F. T.; KITAZAWA, S. E.; NOLL, I. B. Fungos e fumonisinias no período pré-colheita do milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.26, n.1, p.7-10, 2006.

HUANG, A.; LI, J.W.; SHEN, Z.Q.; WANG, X.W.; JIN, M. High-throughput identification of clinical pathogenic fungi by hybridization to an oligonucleotide microarray. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.9, p.3299-3305, 2006.

HUANG, H.; LIU, L.; NGADI, M.O. Recent developments in hyperspectral imaging for assessment of food quality and safety. *Sensors* v.14, p.7248–7276, 2014.

JAVAID, A., NAQVI, S. F., SHOAIB, A. Antifungal activity of methanolic extracts of *Sorghum halepense* against *Macrophomina phaseolina*. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6, n.28, p. 5814-5818, 2012.

KANDPAL, L. M., LEE, S., KIM, M. S., BAE, H., CHO, B. K. Short wave infrared (SWIR) hyperspectral imaging technique for examination of aflatoxin B1 (AFB1) on corn kernels. *Food Control*, 51, p. 171-176, 2015.

KENNARD, R.W., STONE, L.A. *Computer aided design of experiments*, *Technometrics*, 11, p. 137–148, 1969.

KIL, H.Y.; SEONG, E.S.; GHIMIRE, B.K.; CHUNG, I.; KWON, S.S.; GOH, E.J.; HEO, K.H.; KIM, M.J.; LIM, J.D.; LEE, D.; YU, C.Y. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chemistry*, v.115, p.1234-1239, 2009.

KIMULI, D.; WANG, W.; JIANG, H.; ZHAO, X.; CHU, X.; YANG, Y.; JIA, B. Evaluation of growth characteristics of a mixed culture of toxigenic fungi by Visible/Near-infrared hyperspectral imaging. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, 2018.

KLOPFENSTEIN T.J., ERICKSON G.E., BERGER L. Maize is a critically important source of food, feed, energy and forage in the USA. *Field Crops Research*, v. 153, p.5-11, 2013.

KÖLJALG, U.; NILSSON, R.H.; ABARENKOV, K.; TEDERSOO, L.; TAYLOR, A.F.; BAHRAM, M.; et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, v.22, n.21, p.5271-5277, 2013.

KUCHERYAVSKIY, S.A new approach for discrimination of objects on hyperspectral images. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v.120, p.126–135, 2013.

KUHNEM JÚNIOR, P. R.; STUMPF, R.; SPOLTI, P.; DEL PONTE, E. M. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.43, n.4, p.583–588, 2013.

LAVINE, B.K. *Validation of Classifiers A2*. Walczak, Steven D. Brown Romá Tauler Beata. In: (Ed.) *Comprehensive Chemometrics*. Oxford: Elsevier, p.587-599, 2009.

LIU, T., ZHANG, Q., WANG, L., et al. The use of global transcriptional analysis to reveal the biological and cellular events involved in distinct development phases of *Trichophyton rubrum* conidial germination. *BMC Genomics*, 8:100, 2007.

MACIEL, C. G. *Fusarium sambucinum* associados a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle. 2012. 94p. Dissertação (Mestrando em Engenharia Florestal) – Universidade de Santa Maria, UFSM, Santa Maria – RS.

MANLEY, M. Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: non-destructive analysis of biological materials. *Chemical Society Reviews*, v.43, p.8200–8214, 2014.

MARTINS, M. K. *Variabilidade genética de isolados de Fusarium spp. e estudo da interação com a planta hospedeira*. 2005. 110p. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba – SP.

MAZIERO, M. T., BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.12,n.1, p.89-99, 2010.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E. J.; MANZONI, C. G. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusariumoxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.34,n.1, p.132–139, 2010.

MIGUEL, T. A.; TAKAHASHI, H. W.; BERND, L. P.; MONTAGNER, T.; OMORI, A. M.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Efeitos da fertilização nitrogenada na contaminação de milho por fungos e fumonisinas. *Biosaúde*, Londrina, v.17, n.1, p.21-33, 2015.

MILANESI, P. M. *Aspectos biológicos da interação Fusarium spp. e Trichoderma spp. em solo compactado de aveia preta e soja sob plantio direto*. 2012. 133p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Santa Maria, UFSM, Santa Maria – RS.

MILLER, M.B.; TANG, Y.W. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, v.22, n.4, p.611-633, 2009.

MILLER, R.; ASSI, M, AST INFECTIOUS DISEASES COMMUNITY OF PRACTICE. Endemic fungal infections in solid organ transplantation. *American Journal of Transplantation*, v.13, n.4, p.250-261, 2013.

MONTEIRO, M. C. P. *Identificação de fungos dos gêneros Aspergillus e Penicillium em solos preservados do cerrado*. 2012. 77p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG.

MORAES, E. A., MARINELLI, R. DA S., LENQUISTE, S. A., STEEL, C. J., MENEZES, C. B. DE, QUEIROZ, V. A. V., MARÓSTICA JÚNIOR, M.R. Sorghum flour fractions: Correlations among polysaccharides, phenolic compounds, antioxidant activity and glycemic index. *Food Chemistry*, v.180, p.116–123, 2015.

MOTTA, T. P.; FRIZZARIN, A.; MARTINS, T.; MIRANDA, M. S.; ARCARO, J. R. P.; AMBRÓSIO, L. A.; POZZI, C. R. Estudo sobre a ocorrência de fungos e aflatoxina B1 na dieta de bovinos leiteiros em São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35, n.1, p.23–28, 2015.

MUNKVOLD, G.P.; WHITE, D.G. *Compendium of corn diseases: the American Phytopathological Society*. 40 ed. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society, 2016.

MUSUMARRA, G.; TROVATO-SALINARO, A.; SCIRÈ, S.; FOTI, A.; BARRESI, V.; FORTUNA, C.G.; STRAZZULLA, G.; CONDORELLI, D.F. Identification of genes involved in radiation-induced G1 arrest. *Journal of Chemometrics*, p.398–405, 2007.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, v.1054, p.95–111, 2004.

NEVES, L.C.; ALENCAR, S.M.; CARPES, S.T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. *Brazilian Journal of Food Technology*, p. 107-110, 2009.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v.70, p.461–477, 2007.

NICOLAU, M. C. *Biocontrole de Fusarium verticillioides em milho e trigo*. 2014. 40p. Monografia (Graduação em Tecnologia de alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Londrina – PR.

NILCHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Reviews Phytopathology*, v. 30, p. 369-389, 1992.

NUSS, E.T.; TANUMIHARDJO, S.A. Maize: A paramount staple crop in the context of global nutrition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, p. 417-436, 2010.

OLIVEIRA, A.A.; SIQUEIRA, P.H.; NISGOSKI, S.; BOLZON DE MUNIZ, G.I.; FERREIRA, J.H. Identificação de Madeiras utilizando a Espectrometria no Infravermelho Próximo e Redes Neurais Artificiais. *Tendências em Matemática Aplicada e Computacional*, v.16, n. 2, p. 81-95, 2015.

OLIVEIRA, K.G.; QUEIROZ, V.A.V.; CARLOS, L.A.; CARDOSO, L.M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M.; ANUNCIAÇÃO, P.C.; MENEZES, C.B.; SILVA, E.C.; BARROS, F.A.R. Effect of the storage time and temperature on phenolic compounds of sorghum grain and flour. *Food Chemistry*, v. 216, p. 390-398, 2017.

OSBORNE, B.G., DOUGLAS, S. Measurement of the degree of starch damage in flour by near infrared reflectance analysis. *J. Sci. Food Agric.* 32, p. 328–332, 1981.

OSBORNE, B. G.; FEARN, T. *Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis*. Wiley and Sons: New York. 1986.

PAES, M. C. D. Manipulação da composição química do milho: impacto na indústria e na saúde humana. 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Milho/Index.htm> Acesso em 19/01/2015 página mantida pela Infobibos.

PAIVA, C. L.; QUEIROZ, V. A. V.; SIMEONE, M. L. F.; SCHAFFERT, R. E.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, C. S. da. Mineral contents in sorghum genotypes: influence of water stress. *Food Chemistry*, v. 214, p.400-405, 2017.

PARENTE-ROCHA, J. A., BAILÃO, A. M., AMARAL, A. C., TABORDA, C. P., PACCEZ, J. D., BORGES, C. L., PEREIRA, M. Antifungal resistance, metabolic routes as drug targets, and new antifungal agents: an overview about endemic dimorphic fungi. *Mediators of Inflammation*, v. 2017, p.16, 2017.

PARRAG, V., GILLAY, Z., KOVÁCS, Z., ZITEK, A., BÖHM, K., HINTERSTOISSER, B., et al. Application of hyperspectral imaging to detect toxigenic *Fusarium* infection on cornmeal. *Progress in Agricultural Engineering Sciences*, v. 16, n. 1, p. 51-60, 2020.

PASCALE, M. Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 117, p.15-25, 2009.

PASQUALI, M.; BEYER, M.; LOGRIECO, A.; AUDENAERT, K.; BALMAS, V.; BASLER, R.; BOUTIGNY, A.L.; CHRPOVÁ, J.; CZEMBOR, E.; GAGKAEVA, T.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T.; HOFGAARD, I.S.; KÖYCÜ, N.D.; HOFFMANN, L.; LEVIĆ, J.; MARIN, P.; MIEDANER, T.; MIGHELI, Q.; MORETTI, A.; MÜLLER, M.E.H.; MUNAUT, F.; PARIKKA, P.; PALLEZ-BARTHEL, M.; PIEC, J.; SCAUFLAIRE, J.; SCHERM, B.; STANKOVIĆ, S.; THRANE, U.; UHLIG, S.; VANHEULE, A.; YLI-MATTILA, T.; VOGELGSANG, S. A European database of *Fusariumgraminearum* and *F. culmorum* trichothecene genotypes. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, artigo 406, p.1-11, 2016.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives - A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1026, p. 8-36, 2018.

PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J.P. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. 1 ed. New York: Springer, 2008.

PELUQUE, E. *Isolamento, identificação molecular e potencial toxigênico de fungos e ocorrência de micotoxinas em misturas de cereais comercializados no Brasil*. 2014. 80p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos) – Universidade de São Paulo, USP, Pirassununga – SP.

PEREIRA, K. C.; SANTOS, C. F. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, Brasília, v.15, n.4, p.147-165, 2011.

PEREIRA, V. L., FERNANDES, J. O., CUNHA, S. C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, v.36, n.2, p.96-136, 2014.

PEREIRA, A.V.; SANTANA, G.M.; GÓIS, M.B.; SANT'ANA, D.M.G. *Tannins obtained from medicinal plants extracts against pathogens: antimicrobial potential*.(A. Méndez-Vilas, Ed.) *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* 9p., 2015.

PLEADIN, J., PERSI, N., ZADRAVEC, M., SOKOLOVIC, M., VULIC, A., JAKI, V., et al. Correlation of deoxynivalenol and fumonisin concentration determined in maize by ELISA methods. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, v. 33, n. 4, p.414-421, 2012.

PRITSCH, C.; MUEHLBAUER, G.J.; BUSHNELL, W.R.; SOMERS, D.A.; VANCE, C.P. Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.13, n.2, p.159-169, 2000.

QUEIROZ, V.A.V; ALVES, G.L.O.; CONCEIÇÃO, R.R.P.; MENDES, S.M.; COSTA, R.V.; RIBEIRO, P.E.A. *Ocorrência de fumonisinas em milho armazenado em propriedades familiares da região central de Minas Gerais*. Minas Gerais. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 5p., 2013 (Circular técnica 198).

QUEIROZ, V. A. V.; SILVA, C. S.; MENEZES, C. B.; SCHAFFERT, R. E.; GUIMARÃES, F. F. M.; GUIMARÃES, L. J. M.; GUIMARÃES, P. E. O.; TARDIN, F. D. Nutritional composition of *Sorghum bicolor* (L.) Moench genotypes cultivated without and with water stress. *Journal of Cereal Science*, v. 65, p.103-111, 2015.

QUEIROZ, V.A.V.; OLIVEIRA, K.G.; PAIVA, C.L.; CARLOS, L.A.; MENEZES, C.B.; BARROS, F.A.R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M.; ANUNCIAÇÃO, P.C. Retention of some flavones and flavanones in flour, grain and bran of sorghum during storage. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.17, n.3, p. 522-534, 2018.

RANUM P., PENA-ROSAS J.P., GARCIA-CASAL M.N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Issue: Technical Considerations for Maize Flour and Corn Meal Fortification in Public Health. 1312, 1. DOI: 10.1111/nyas.12396, 2014.

RATNAVATHI, C. V., SASHIDHAR, R. B. Inhibitory effect of phenolics extracted from *Sorghum* genotypes on *Aspergillus parasiticus* (NRRL 2999) growth and aflatoxin production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), 1140-1148, 2007.

RINNAN, A.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S.B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *Trends in Analytical Chemistry*, v.28, p.1201–1222, 2009.

ROCHA, M. E. B., FREIRE, F. D. C. O., MAIA, F. E. F., GUEDES, M. I. F., RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, v. 36, n. 1, p.159-165, 2014.

SANDOVAL, C. M. R. *Reconocimiento taxonómico preliminar de Fusarium roseum (clasificación pendiente) responsable de la pudrición basal del clavel comercial en la sabana de Bogotá*. 2010. 114p. Monografía (Graduação em Biologia) – Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá - Colômbia.

SANTIN, J. A.; REIS, E. M.; MATSUMURA, A. T. S.; MORAES, M. G. Efeito do retardamento da colheita de milho na incidência de grãos ardidos e de fungos patogênicos. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.3, n.2, p.182-192, 2004.

SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. *Jour Clin Microbiology*, p. 1917–1920, 2005.

SANTOS, P.M.; CARDOSO, M.A.G.; KHOURI, S.; PAULA JÚNIOR, A.R.; UEHARA, M.; SAKANE, K.K. Utilização da microespectroscopia infravermelha (FT-IR) para teste de algoritmos estatísticos na diferenciação dos microorganismos *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis*. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v.28, n.4, p.398-409, 2012.

SARVER, B.A.; WARD, T.J.; GALE, L.R.; BROZ, K.; KISTLER, H.C.; AOKI, T.; NICHOLSON, P.; CARTER, J.; O'DONNELL, K. Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genetics and Biology*, v.48, n. 12, p.1096-1107, 2011.

SATYA, V.K.; RADHAJEYALAKSHMI, R.; KAVITHA, K.; BHASKARAN, V.P.; VELAZHAHAN, R. In vitro antimicrobial activity of zimmu (*Allium sativum* L.; *Allium cepa* L.) leaf extract. *Archives Phytopathology Plant Protects*, v.38, p.185–192, 2005.

SCHURT, D.A.; SEABRA, S.S.S.; SILVA, A.A.; MARTINS, S.A.; MEDEIROS, F.H.V. Tratamentos químicos e biológicos de sementes para controle da mela do feijão-caupi. *Revista Agri-Environmental Sciences*, v.3, n.1, p.30-36, 2017.

SCORZONI, L.; SANGALLI-LEITE, F.; SINGULANI, J.L.; SILVA, A.C.A.P.; COSTA-ORLANDI, C.B.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; Mendes-Giannini, M.J.S. Searching new antifungals: The use of *in vitro* and *in vivo* methods for evaluation of natural compounds. *Journal of Microbiological Methods*, v.123, p.68–78, 2016.

SENTHILKUMAR, T.; JAYAS, D.S.; WHITE, N.D.G.; FIELDS, P.G.; GRAFENHAN, T. Detection of fungal infection and Ochratoxin A contamination in stored barley using near-infrared hyperspectral imaging. *Biosystems Engineering*, v.147, p.162-173, 2016.

SENTHILKUMAR, T.; JAYAS, D.S.; WHITE, N.D.G.; FIELDS, P.G.; GRAFENHAN, T. Detection of ochratoxin A contamination in stored wheat using near-infrared hyperspectral imaging. *Infrared Physics & Technology*, v.81, p.228–235, 2017.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; DAUER, A.; AURA, A.M.; SAURACALIXTO, F. Tanins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 53, p. 310-329, 2009.

SINGLETON, VL et al. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v. 299, p. 152- 177, 1999.

SILVA, N.C.C.; FERNANDES JUNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v.16, 2010.

SILVA, D. D.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; LANZA, F. E.; GUIMARÃES, E. A. *Micotoxinas em cadeias produtivas do milho: Riscos à saúde animal e humana*. Embrapa Milho e Sorgo, 27p. 2015.

SIMAS, M.M.S. *Efeito da radiação gama sobre microbiota fúngica e micotoxinas encontradas em ração de frangos de corte*. 2010, 63p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP.

SOARES, S.F.C. *Um novo método para transferência de modelos de calibração NIR e uma nova estratégia para classificação de sementes de algodão usando imagem hiperespectral NIR*. 2016. 121p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, PB.

SOKOLOVA, M.; JAPKOWICZ, N.; SZPAKOWICZ, S. *Beyond Accuracy, F-Score and ROC: A Family of Discriminant Measures for Performance Evaluation*. In: *Advances in Artificial Intelligence: 19th Australian Joint Conference on Artificial Intelligence* (edited by A. Sattar & B. Kang), p.1015–1021, Springer Berlin Heidelberg, 2006.

SOUZA, L.K.H.; OLIVEIRA, C.M.A.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C.; OLIVEIRA JUNIOR, J.G.; MIRANDA, A.T.B.; LIÃO, L. M.; SILVA, M.R.R. Antifungal properties of Brazilian Cerrado plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.33, p.247-249, 2002.

SOUZA, M. *Comparação de técnicas moleculares para identificação das espécies de Fusarium de amostras clínicas*. 2014, 88p. Dissertação (mestrado em Ciências na área de concentração Clínica Médica). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, SP.

STASIEWICZ, M. J., FALADE, T. D., MUTUMA, M., et al. Multi-spectral kernel sorting to reduce aflatoxins and fumonisins in Kenyan maize. *Food Control*, v. 78, p. 203-214, 2017.

STUMPF, R.; DOS SANTOS, J.; GOMES, L. B.; SILVA, C. N.; TESSMANN, D.J.; FERREIRA, F. D.; MACHINSKI JUNIOR, M.; DEL PONTE, E. M. *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.44, n.1, p.89-95, 2013.

STURARO, L.L. *Avaliação da plataforma de DNA microarray na identificação de fungos patogênicos a partir de frascos de hemocultura*. 2018, 121p. Dissertação (mestrado em Ciências na área de concentração Clínica Médica). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, SP.

TEIXEIRA, L. C. *Efeitos da zearalenona em leitões pré-púberes e eficácia de aditivo anti-micotoxina na prevenção da micotoxicose*. 2010. 101p. Dissertação

(Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba – PR.

TEKLE, S., MÂGE, I., SEGTMAN, V. H., et al. Near-infrared hyperspectral imaging of Fusarium-damaged oats (*Avena sativa* L.). *Cereal Chemistry*, v. 92, n. 1, p. 73-80, 2015.

VICHAPONG J.; SOOKSERM, M.; SRIJESDARUK, V.; SWATSITANG, P.; SRIJARANAI, S. High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. *Food Science and Technology*, v. 43, p.1325-1330, 2010.

VILLANI, M.M. *Manejo fitossanitário na cultura do milho (Zea mays L.)*. 2016. 35p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, UNIJUÍ, Ijuí – RS.

VU, D.; GROENEWALD, M.; DE VRIES, M.; GEHRMANN, T.; STIELOW, B.; EBERHARDT, U.; AL-HATMI, A.; GROENEWALD, J.Z.; CARDINALI, G.; HOUBRAKEN, J.; BOEKHOUT, T.; CROUS, P.W.; ROBERT, V.; VERKLEY, G.J.M. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology*, v.92, p.135-154, 2019.

WALDER, F.; SCHLAEPPI, K.; WITTEW, R.; HELD, A.Y.; VOGELGSANG, S.; VAN DER HEIJDEN, M.G.A. Community profiling of *Fusarium* in combination with other plant-associated Fungi in different crop species using SMRT sequencing. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p.1-17,2017.

WANG, W., HEITSCHMIDT, G. W., NI, X., WINDHAM, W. R., HAWKINS, S., CHU, X. Identification of aflatoxin B1 on maize kernel surfaces using hyperspectral imaging. *Food Control*, v. 42, p. 78-86, 2014.

WANG, W., LAWRENCE, K. C., NI, X., YOON, S. C., HEITSCHMIDT, G. W., FELDNER, P. Near-infrared hyperspectral imaging for detecting Aflatoxin B1 of maize kernels. *Food Control*, v. 51, p. 347-355, 2015.

WILLIAMS, P.C., SOBERING, D. How do we do it: A brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations, A.M.C. Daves, P.C. Williams (Eds.), *Near infrared spectroscopy: The future waves*, NIR Publications, Chichester, UK, p. 185– 188, 1996.

WILLIAMS, P.; MANLEY, M.; FOX, G.; GELADI, P. Indirect detection of *Fusarium verticillioides* in maize (*Zea mays* L.) kernels by near infrared hyperspectral imaging. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 18, p.49-58, 2010.

WILLIAMS, P.J.; GELADI, P.; BRITZ, T.J.; MANLEY, M. Near-infrared (NIR) hyperspectral imaging and multivariate image analysis to study growth characteristics and differences between species and strains of members of the genus *Fusarium*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 404, p. 1759–1769, 2012a.

WILLIAMS, P.J.; GELADI, P.; BRITZ, T.J.; MANLEY, M. Investigation of fungal development in maize kernels using NIR hyperspectral imaging and multivariate data analysis. *Journal of Cereal Science*, v.55, p.272–278, 2012b.

WILLIAMS, P.J.; GELADI, P.; BRITZ, T.J.; MANLEY, M. Growth characteristics of three *Fusarium* species evaluated by near-infrared hyperspectral imaging and multivariate image analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.96, p.803–813, 2012c.

WILLIAMS, P.J. *Near infrared (NIR) hyperspectral imaging and X-ray computed tomography combined with statistical and multivariate data analysis to study Fusarium infection in maize*. 2013. Tese (Doutorado). Stellenbosch University, Stellenbosch, África do Sul.

WILLIAMS, P.J.; KUCHERYAVSKIY, S. Classification of maize kernels using NIR hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, v. 209, p.131–138, 2016.

WILLIAMS, P. J.; BEZUIDENHOUT, C.; ROSE, L. J. Differentiation of maize ear rot pathogens, on growth media, with near infrared hyperspectral imaging. *Food Analytical Methods*, p. 1-15, 2019.

WU, D.; WANG, S.; WANG, N.; NIE, P.; HE, Y.; SUN, D.W.; YAO, J. Application of time series hyperspectral imaging (TS-HSI) for determining water distribution within beef and spectral kinetic analysis during dehydration. *Food and Bioprocess Technology*, v.6, p.2943–2958, 2013.

XUE, Y.; YUE, S.; ZHANG, W.; LIU, D.; CUI, Z.; CHEN, X.; YE, Y.; ZOU, C. Zinc, iron, manganese and copper uptake requirement in response to nitrogen supply and the increased grain yield of summer maize. *PLoS ONE*, 9, e93895, 2014.

YAO, H.; HRUSKA, Z.; KINCAID, R.; BROWN, R.L.; CLEVELAND, T.E. Differentiation of toxigenic fungi using hyperspectral imagery. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, v.2, p.215–224, 2008.

YAO, H., HRUSKA, Z., KINCAID, R., BROWN, R. L., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T. E. Hyperspectral image classification and development of fluorescence index for single corn kernels infected with *Aspergillus flavus*. *Transactions of the ASABE*, v.56, n.5, p. 1977-1988, 2013.

ZAMARIOLA, N. *Estudo da mobilidade de micotoxinas em solo sob condições de clima tropical*. 2016. 140p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP.

ZHU, F., YAO, H., HRUSKA, Z., KINCAID, R., BROWN, R. L., BHATNAGAR, D., & CLEVELAND, T. E. Visible near-infrared (VNIR) reflectance hyperspectral imagery for identifying aflatoxin-contaminated corn kernels. *In 2015 ASABE Annual International Meeting* (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2015.

10 PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS





11 PUBLICAÇÕES

Artigo da Tese: Capítulo I

CONCEIÇÃO, R. R. P., SIMEONE, M. L. F., QUEIROZ, V. A. V., DE MEDEIROS, E. P., DE ARAÚJO, J. B., COUTINHO, W. M., ... & DE RESENDE STOIANOFF, M. A. Application of near-infrared hyperspectral (NIR) images combined with multivariate image analysis in the differentiation of two mycotoxicogenic *Fusarium* species associated with maize. *Food Chemistry*, 344, 128615, 2021.


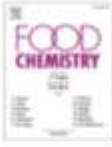
Food Chemistry/Editor-in-Chief: Dr. Paul Finglas/CiteScore: 10.7 Impact Factor: 7.8


Food Chemistry 344 (2021) 128615

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Application of near-infrared hyperspectral (NIR) images combined with multivariate image analysis in the differentiation of two mycotoxicogenic *Fusarium* species associated with maize

Renata Regina Pereira da Conceição^{a,*}, Maria Lúcia Ferreira Simeone^b, Valéria Aparecida Vieira Queiroz^b, Everaldo Paulo de Medeiros^c, Joabson Borges de Araújo^c, Wirton Macedo Coutinho^c, Dagma Dionísia da Silva^b, Rafael de Araújo Miguel^b, Ubiraci Gomes de Paula Lana^b, Maria Aparecida de Resende Stoianoff^a

^a Federal University of Minas Gerais, Nation of Biological Sciences, Av. Antônio Carlos, 6627 Fungulus, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270-901, Brazil
^b Estrada Milão e Sanga, Rodovia MG 424, km 45, São João del-Rei, Minas Gerais CEP 35701-670, Brazil
^c Estrada Alameda, R. Onésio Cruz, 1143, Coronário, Campina Oreada, Paraíba CEP 55420-095, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Zea mays L.
Mycotoxins
Fungal identification
Non-destructive analysis
Hyperspectral image

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most versatile crops worldwide with high socio-economic relevance. However, mycotoxins produced by pathogenic fungi are of constant concern in maize production, as they pose serious risks to human and animal health. Thus, the search for rapid detection and/or identification methods for mycotoxins and mycotoxin-producing fungi for application in food safety remains important. In this work, we implemented use of near infrared hyperspectral images (NIR-NIR) combined with pattern recognition analysis, partial-least-squares discriminant analysis (PLS-DA) of images, to develop a rapid method for identification of *Fusarium verticillioides* and *F. graminearum*. Validation of the NIR-NIR method and subsequent analysis was realized using 15 *Fusarium* spp. isolates. The method was efficient as a rapid, non-invasive, and non-destructive assessment was achieved with 100% accuracy, sensitivity, and specificity for both fungi.